

• 药理与临床 •

四物汤中糖类物质对辐射小鼠造血功能的影响

梁乾德, 朱力军, 谭洪玲, 马百平, 高 月, 王升启*

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘 要:目的 初步探讨四物汤中糖类物质与四物汤补血作用的关系。方法 四物汤部位分离采用醇沉法、萃取法和大孔吸附树脂法。用辐射小鼠血虚证模型考察活性。结果 将前期发现的具有提高辐射血虚模型小鼠外周血白细胞数和促进骨髓造血祖细胞增殖作用的四物汤部位 C2(正丁醇部位), 用吸附树脂法分离为 C2-1(糖部分)和 C2-2(非糖部分)两个部位。活性研究表明部位 C2-1 具有提高模型小鼠外周血白细胞数和促进骨髓造血祖细胞增殖的作用, 部位 C2-2 仅显示促进骨髓造血祖细胞增殖的作用。按照部位 C2 中糖类的组成和质量分数, 将 D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖混合, 活性研究表明混合糖具有促进模型小鼠骨髓造血祖细胞增殖的作用, 但对外周血白细胞的作用不显著。结论 单、双糖类物质对四物汤促进辐射小鼠造血功能的作用有一定贡献。

关键词: 四物汤; 造血功能; 糖类; 辐射小鼠

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)02-0226-04

Effects of saccharides in Si-Wu-Tang on hematopoietic function in irradiated mice

LIANG Qian-de, ZHU Li-jun, TAN Hong-ling, MA Bai-ping, GAO Yue, WANG Sheng-qi

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: **Objective** To make preliminary study on the relationship between saccharides and blood-tonifying effect of Si-Wu-Tang. **Methods** Si-Wu-Tang was fractionated by ethanol precipitation, extraction, and macroporous adsorption resin chromatography. Activity was investigated on irradiated mice as model of blood deficiency. **Results** The fraction C2 (*n*-butanol fraction), which had previously shown activity of raising the amount of peripheral leukocyte and promoting the proliferation of hematopoietic progenitor cell in bone marrow of irradiated mice, was separated into two fractions, fraction C2-1 (saccharide fraction) and C2-2 (non-saccharide fraction), by macroporous adsorption resin chromatography. Activity experiment showed that fraction C2-1 could raise the amount of peripheral leukocyte and promote the proliferation of hematopoietic progenitor cell in bone marrow of irradiated mice, while fraction C2-2 showed only the effect of promoting the proliferation of hematopoietic progenitor cell in bone marrow. Then, according to the composition and contents of saccharides in fraction C2, *D*-fructose, *D*-glucose, and sucrose were mixed. Activity experiment showed that the saccharide mixture could promote the proliferation of hematopoietic progenitor cell in bone marrow of irradiated mice, but the effect of raising the amount of peripheral leukocyte was not significant. **Conclusion** To some extents, the monosaccharide and disaccharide contribute to Si-Wu-Tang's effect of improving hematopoietic function in irradiated mice.

Key words: Si-Wu-Tang; hematopoietic function; saccharide; irradiated mice

方剂药效物质基础是中药现代研究的关键问题之一。四物汤是补血经典方剂, 多项现代研究显示其具有促进机体造血功能的作用, 但其物质基础尚不清楚^[1]。前期工作^[2]将四物汤分离为 C1、C2、C3 等部位, 发现部位 C2(正丁醇部位)和部位 C3 具有

提高辐射致血虚证模型小鼠外周血白细胞数和促进骨髓造血祖细胞增殖的作用, 而部位 C1 作用不显著。化学分析^[3]表明部位 C2 和部位 C3 均含有单糖和二糖, 部位 C1 含糖极少, 部位 C1 和部位 C2 均含有芍药苷, 并且发现芍药苷具有促进辐射小鼠骨

收稿日期: 2005-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30271617, 30070913); 军队“十五”重点项目 (01Z019); 北京市“二四八”重大创新工程项目 (H010210220113)

作者简介: 梁乾德 (1971—), 男, 吉林省农安县人, 军事医学科学院助理研究员, 博士, 1994 年毕业于北京中医药大学中药系, 2000 年、2003 年获得军事医学科学院药物分析学硕士、博士学位, 主要从事中药现代化基础研究及新药研究。

Tel: (010) 66931422 E-mail: liangqiande@yahoo.com.cn

* 通讯作者 王升启 Tel: (010) 66932211 Fax: (010) 66932211 E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

髓造血祖细胞增殖的作用。本研究考察四物汤部位 C2 中的糖类物质对辐射小鼠造血功能的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与仪器:四物汤各药材饮片购于北京同仁堂药店,经军事医学科学院马百平副研究员鉴定,分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch., 伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, 川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort., 毛茛科芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的根及根茎加工而成。无水乙醇、醋酸乙酯、正丁醇、D-葡萄糖和蔗糖为国产分析纯。D-果糖为国产生化试剂。SP825 型吸附树脂为日本三菱产品。Sysmex—820 自动血球计数仪,日本;QT—3 型 γ 剂量辐射检测控制仪,军事医学科学院;Napco—5410 CO₂ 培养箱,美国;Labofuge 400R 型低温离心机,德国;TGL—16G 台式高速离心机,国产;CJT—Z—I 洁净工作台,国产;Coic 显微镜,国产。

1.2 四物汤提取部位的制备:制备四物汤水煎液(熟地、当归、白芍、川芎的用量比例为 15:10:10:6)。将四物汤水煎液在低于 60℃ 下浓缩至约为原体积的 1/5~1/6,然后在不断搅拌下,滴加乙醇至乙醇体积分数为 20%,离心并弃去沉淀,上清液继续加乙醇至乙醇体积分数为 40%,离心得沉淀(部位 B1),上清液继续加乙醇至乙醇体积分数为 60%,离心得沉淀(部位 B2),上清液继续加乙醇至体积分数为 80%,离心得沉淀(部位 B3),上清液浓缩至无乙醇味,加适量水稀释,分别以醋酸乙酯、正丁醇萃取,每种溶剂萃取 3 次,萃取液浓缩至干分别得到醋酸乙酯部位(部位 C1,含芍药苷 14%、阿魏酸 4%)和正丁醇部位(部位 C2,含果糖 16%、葡萄糖 10%、蔗糖 22%、芍药苷 9%),余下的药液浓缩得部位 C3(含果糖 9%、葡萄糖 7%、蔗糖 31%)。将部位 C2 用水溶解后上大孔吸附树脂柱,用水洗脱,洗脱液减压浓缩得部位 C2-1(预试验 TLC 检识见单糖和二糖斑点,未见芍药苷斑点);然后用 80% 乙醇洗脱,洗脱液减压浓缩得部位 C2-2(预试验 TLC 检识未见单糖和二糖斑点,见芍药苷斑点)。

1.3 四物汤水煎浓缩液的制备:制备四物汤水煎液(各药味用量比例同 1.2 项),在低于 60℃ 下浓缩至含四物汤生药 1 g/mL 的浓缩液(含果糖 33 mg/mL、葡萄糖 24 mg/mL、蔗糖 113 mg/mL、芍药苷 2.6 mg/mL、阿魏酸 0.2 mg/mL)。

1.4 单双糖混合溶液的制备:按部位 C2 中所含果糖、葡萄糖和蔗糖的量,将 D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖

混合并用水溶解,得单双糖混合溶液(含果糖 3.2 mg/mL、葡萄糖 1.9 mg/mL、蔗糖 4.3 mg/mL)。

1.5 辐射血虚证模型小鼠外周血白细胞检测:C57BL/6J 小鼠,二级,雌性,6~8 周龄,体重(20±2) g,由军事医学科学院实验动物中心提供。常规饲养数天适应环境后,按体重随机分组,经⁶⁰Co γ 射线全身一次照射,剂量为 3.5 Gy,照射距离 4 m,制备血虚证动物模型。各组小鼠造模后立即 ig 给予相应受试药物,给药剂量(以相当于四物汤生药用量表示)为 10 g/(kg·d),每只 0.2 mL,每天 1 次,连续 7 d。模型对照组 ig 给予同体积生理盐水。分别于小鼠造模及给药后第 0、3、5、7、10、13 天,每只小鼠尾静脉取血 20 μ L,用自动血球计数仪检测外周血白细胞数目。

1.6 辐射血虚证模型小鼠骨髓造血祖细胞集落培养:模型制备及给药方法同 1.5 项。增设正常组,小鼠不照射,ig 给予生理盐水。造模及给药后第 8 天,每组处死 3 或 4 只小鼠,取股骨骨髓混合后按文献方法^[4]进行集落培养,检测粒系(CFU-GM)、红系(CFU-E、BFU-E)、混合系(CFU-MIX)造血祖细胞。

1.7 四物汤 C2-1 和 C2-2 部位的活性考察:将四物汤水煎浓缩液,部位 C2-1、C2-2、C1、C2、C3 的水溶液(相当于四物汤生药 1 g/mL 获得的提取部位),作为受试药物考察其对辐射小鼠外周血白细胞和骨髓造血祖细胞的影响。

1.8 单双糖混合液的活性考察:将四物汤水煎浓缩液、单双糖混合液、部位 C2-1、C2 的水溶液(相当于四物汤生药 1 g/mL 获得的提取部位)作为受试药物,考察其对辐射小鼠外周血白细胞和骨髓造血祖细胞的影响。

1.9 统计学处理:各数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行 t 检验。

2 结果

2.1 受试药物对辐射模型小鼠外周血白细胞和骨髓造血祖细胞的影响:结果见表 1 和 2。小鼠经辐射后外周血白细胞数显著降低,而后随时间呈缓慢回升的趋势;各系骨髓造血祖细胞集落数亦显著降低。四物汤具有提高血虚证模型小鼠外周血白细胞数的作用,各时间点的白细胞数均显著高于模型组($P < 0.05$),并且能促进模型小鼠骨髓造血祖细胞的增殖,各系祖细胞集落数均高于模型组($P < 0.05$)。部位 C2 和部位 C3 也具有提高模型小鼠外周血白细胞数的作用。部位 C2 第 3 天和部位 C3 第 13 天的结果高于模型组($P < 0.05$),并且能促进造血祖细

胞的增殖,各系祖细胞集落数均高于模型组 ($P < 0.05$)。部位 C1 活性不显著。这些与以往的研究结果^[3]一致。部位 C2-1 具有提高模型小鼠外周血白细胞数的作用,其第 5、7、13 天的结果高于模型组 ($P < 0.05$),并且能促进各系造血祖细胞的增殖

($P < 0.05$);部位 C2-2 对外周血白细胞的影响不显著,但在造血祖细胞指标上,对 CFU-GM 和 CFU-E 两系的集落数有提高 ($P < 0.05$)。可见,部位 C2-1 和部位 C2-2 均有一定的促进模型小鼠造血功能的作用。

表 1 四物汤及其部位 C2-1、C2-2、C1、C2、C3 对辐射小鼠外周血白细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects of Si-Wu-Tang and its fractions C2-1, C2-2, C1, C2, and C3 on peripheral leukocyte in irradiated mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	白细胞计数/($10^9 \cdot L^{-1}$)					
	第 0 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 10 天	第 13 天
模型	12.8±3.6	1.6±0.5	2.4±0.7	2.8±0.4	3.7±0.7	3.9±1.0
四物汤	12.3±4.1	3.5±1.5*	5.1±1.4*	5.4±1.9*	5.5±0.5*	6.6±1.1*
部位 C1	13.6±2.1	2.0±0.9	3.4±0.5	2.4±0.7	2.9±0.4	4.7±1.6
部位 C2	10.3±3.4	2.7±1.2*	2.9±1.1	4.0±1.2	4.9±1.6	5.3±1.0
部位 C3	12.0±4.1	1.4±0.6	2.7±1.1	3.7±1.4	4.2±0.9	6.9±1.1*
部位 C2-1	10.7±3.4	1.6±0.4	3.6±1.5*	4.2±1.6*	4.8±1.2	6.9±1.3*
部位 C2-2	10.8±4.1	1.4±0.4	2.2±0.3	3.3±1.0	3.9±1.4	5.9±0.7

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

表 2 四物汤及其部位 C2-1、C2-2、C1、C2、C3 对辐射小鼠骨髓造血祖细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 2 Effects of Si-Wu-Tang and its fractions C2-1, C2-2, C1, C2, and C3 on bone marrow progenitor cells proliferation in irradiated mice ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组 别	造血祖细胞集落数/($\text{个} \cdot 10^{-5}$ 骨髓造血祖细胞)			
	CFU-GM	CFU-E	BFU-E	CFU-MIX
正常	72.3±8.1*	50.0±5.6*	42.3±5.4*	31.5±3.9*
模型	23.8±4.0	12.3±3.5	9.0±2.9	10.3±1.7
四物汤	54.8±7.6*	28.5±3.4*	37.0±3.9*	25.0±4.2*
部位 C1	22.3±4.8	14.8±4.0	5.3±1.0	12.8±3.4
部位 C2	45.5±4.7*	23.0±3.7*	22.0±4.6*	22.5±5.1*
部位 C3	37.3±5.4*	19.8±2.9*	18.5±3.2*	17.8±5.0*
部位 C2-1	43.0±5.0*	21.8±3.6*	23.5±2.5*	20.8±4.2*
部位 C2-2	31.8±7.1*	17.3±3.5*	13.3±2.2	14.8±3.7

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

2.2 单双糖混合液对模型小鼠外周血白细胞和骨髓造血细胞的影响:见表 3 和 4。结果表明,四物汤

具有提高血虚小鼠外周血白细胞数的作用,其在第 3、13 天的结果高于模型组 ($P < 0.05$),并且对各系造血祖细胞均有促进增殖作用 ($P < 0.05$);部位 C2 和部位 C2-1 均有不同程度提高模型小鼠外周血白细胞数和促进造血祖细胞增殖的作用。这些均与以往的结果一致。单双糖混合液对模型小鼠外周血白细胞未见显著影响,但对 CFU-GM、CFU-E 和 CFU-MIX 3 个细胞系的造血祖细胞有促进增殖作用 ($P < 0.05$),表明单双糖混合液具有一定促进模型小鼠造血功能的作用。

3 讨论和结论

3.1 前期工作^[2,3,5]考察了四物汤 C1、C2、C3 部位对辐射致血虚证模型小鼠外周血白细胞和骨髓造血祖细胞增殖的影响,以及各部位化学成分的特点,发现部位 C2 和 C3 均具有与四物汤类似的提高模型小鼠外周血白细胞数和促进骨髓造血祖细胞增殖的

表 3 四物汤、单双糖混合液和部位 C2-1、C2 对辐射小鼠外周血白细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effects of Si-Wu-Tang, saccharide mixture, fractions C2-1 and C2 on peripheral leukocyte in irradiated mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	白细胞计数/($10^9 \cdot L^{-1}$)					
	第 0 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 10 天	第 13 天
模型	15.6±2.5	1.4±0.4	2.2±0.3	3.9±0.5	4.6±0.9	3.6±0.7
四物汤	14.3±2.4	1.8±0.2*	2.8±0.8	4.2±1.4	4.5±0.3	4.7±0.7*
单双糖混合液	15.5±3.2	1.4±0.2	2.3±0.6	3.6±0.7	4.4±0.8	4.1±0.2
部位 C2	16.1±3.1	1.3±0.2	2.5±0.4	3.8±0.6	4.8±0.8	4.3±0.6*
部位 C2-1	15.1±4.4	1.4±0.3	3.0±0.5*	4.4±0.9	5.0±0.7	4.6±1.0*

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

表 4 四物汤、单双糖混合液和部位 C2-1、C2 对辐射小鼠骨髓造血祖细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Effects of Si-Wu-Tang, monosaccharide and disaccharide mixture, fractions C2-1 and C2 on bone marrow progenitor cell proliferation in irradiated mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	造血祖细胞集落数/(个· 10^{-5} 骨髓造血祖细胞)			
	CFU-GM	CFU-E	BFU-E	CFU-MIX
正常	73.5±5.5*	53.0±7.3*	40.3±5.2*	28.5±5.0*
模型	21.3±3.8	13.0±3.7	13.3±3.8	10.5±3.7
四物汤	56.0±5.6*	40.8±3.5*	34.8±4.6*	18.8±4.0*
单双糖混合液	33.5±6.2*	32.3±4.7*	18.0±3.2	17.5±2.4*
部位 C2	30.8±5.1*	34.5±6.0*	22.0±3.4*	17.8±3.4*
部位 C2-1	28.5±4.8*	32.8±3.4*	20.5±4.7	17.5±2.1*

与模型组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs model group

作用,而部位 C1 作用不显著;部位 C2 和 C3 均以单、双糖为主要成分,部位 C1 含有种类丰富的成分而糖类极少,部位 C1 和 C2 均含有芍药苷;芍药苷单体具有促进骨髓造血祖细胞增殖的作用,为四物汤促进造血功能的活性成分之一。本研究用大孔吸附树脂将部位 C2 分离为水洗脱部分(部位 C2-1,以糖类为主)和 80% 乙醇洗脱部分(部位 C2-2,以脂溶性相对较高的苷类等为主),结果表明,两个部位均有一定促进辐射小鼠造血功能的作用,提示糖类可能具有活性。为了进一步确证,按照部位 C2 中主要糖类物质的组成和质量分数,将 D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖混合,结果显示仍具有一定的促进辐射

小鼠骨髓造血祖细胞增殖的作用,表明单、双糖类对四物汤促进造血功能的作用确有一定的贡献。虽然单、双糖类是植物中常见的成分,其改善小鼠造血功能的机制不排除可能与提供营养有关,但此结果在一定程度上提示了中药作用机制的特殊性和复杂性,有待进一步研究。

3.2 从活性考察结果还可看出,部位 C2-1 提高辐射小鼠外周血白细胞和促进骨髓造血祖细胞增殖的作用均显著,而混合糖仅促进骨髓造血祖细胞增殖的作用显著。这可能与大孔吸附树脂仅能实现粗分离,部位 C2-1 中还含有微量的单、双糖以外的其他活性物质,因而作用更强有关。

References:

- [1] Liang Q D, Wang S Q, Gao Y. Development in basal research of Si-Wu-Tang [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 2003, 20(5): 83-86.
- [2] Liang Q D, Lu X Q, Ma Z C, et al. Preliminary study on hematopoietic constituents of Si-Wu-Tang [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(6): 546-549.
- [3] Liang Q D, Ma B P, Li W H, et al. Investigation of constituents in Si-Wu-Tang fractions by chromatographic and ESI-MS methods [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(4): 334-339.
- [4] Liu X Z. *A Laboratory Manual on Technology of Hematopoietic Progenitor Cell Culture* (造血祖细胞培养技术实验手册) [M]. Beijing: Beijing's Publishing House, 1993.
- [5] Liang Q D, Li W H, Wang H X, et al. Saccharide analysis of Si-Wu-Tang by automated multiple development and off-line coupling thin layer chromatography electrospray ionization mass spectrometry techniques [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(7): 632-635.

三七皂苷 R_{g1}对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用及机制探讨

吴兰鸥, 詹合琴, 闫俊岭, 蔡文锋, 吴进平, 杨克红

(昆明医学院 药理学教研室, 云南 昆明 650031)

摘 要:目的 探讨三七皂苷 R_{g1}对局灶性脑缺血-再灌注损伤大鼠大脑皮质中脑源性神经营养因子(BDNF)阳性蛋白的水平和阳性神经元数目是否具有上调作用。方法 选取成年雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为脑缺血-再灌注模型组、三七皂苷 R_{g1}高、中、低剂量(200、100、50 mg/kg)组和阳性对照(尼莫地平,1 mg/kg)组,采用线栓法制大鼠局灶性脑缺血-再灌注模型,各组 ig 给药并分别于给药后 1、3、7 d 随机取 4 只大鼠,以灌注法取脑组织,冰冻法切片,免疫组织化学 ABC 法染色,用高清晰度彩色病理图文报告分析系统测量、分析各组大鼠大脑皮质中 BDNF 阳性蛋白的水平和阳性神经元数目的变化,并观察大鼠脑缺血-再灌注后的神经功能缺失症状。结果 与模型组相比,三七皂苷 R_{g1}高、中、低剂量均能明显改善脑缺血-再灌注的神经功能缺失症状,并能上调大鼠脑缺血-再灌注损伤的大脑皮质中 BDNF 阳性蛋白的水平和阳性神经元数量($P<0.05$);各剂量的作用强于或相当于阳性对照。结论 三七皂苷 R_{g1}能上调 BDNF 阳性蛋白的表达,通过 BDNF 对脑缺血-再灌注神经元损伤所起的保护作用

收稿日期:2005-05-09

基金项目:云南省自然科学基金项目(2002C0051m)

作者简介:吴兰鸥(1959—),女,浙江湖州人,药理学硕士,教授,硕士生导师,现为昆明医学院基础医学院药理学教研室主任,主要从事心脑血管药物药理及毒理学研究。Tel: (0871) 5338954 E-mail: lanouwu@126.com