

化合物、芪类(stilbene, 1, 2-二苯乙烯)^[1,2]、苯丙酸类化合物的相关生物活性研究较多。其生物活性表现在抗炎、抗氧化^[4,5]作用,抑制环氧酶(COX)^[6]活性,镇痛,对癌细胞的毒性作用,抑制5 α 还原酶活性,抑制苏氨酸酶活性等。其中抗炎、抗氧化,抑制环氧酶(COX)活性,镇痛作用与抗RA密切相关。

本实验选取了小鼠醋酸扭体法、小鼠热板法疼痛试验以及二甲苯致小鼠耳廓肿胀、醋酸诱导的毛细血管通透急性炎症模型和大鼠棉球肉芽肿的慢性炎症模型,观察白桂木不同提取部位的活性,实验结果表明白桂木根醋酸乙酯提取物有镇痛作用和对炎症中出现的变质渗出和增生都有较好的抑制作用,这表明该部位具有较好的抗炎镇痛活性,初步揭示白桂木醋酸乙酯提取物在治疗RA中的作用,但有关白桂木的镇痛抗炎作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 甘茂罗, 欧阳胜, 谢平, 等. 白桂木的化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(7): 988-989
- [2] 陈黎明, 谢平, 肖庆青, 等. 白桂木化学成分研究[J]. 中草药, 2007, 38(6): 815-818
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学[J]. 北京: 人民卫生出版社, 2002
- [4] Oh H, Ko E K, Jun J Y, et al. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of prenylflavonoids, coumarin, and stilbene from *Morus alba* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(10): 932-934
- [5] Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, et al. Oxysveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cell [J]. *Nitric Oxide*, 2003, 9(2): 64-76
- [6] Su B N, Cuendet M, Hawthorne M E, et al. Constituents of the bark and twigs of *Artocarpus dadah* with cyclooxygenase inhibitory activity [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(2): 163-169

生血丸对骨髓抑制小鼠造血功能的调控作用

严苏纯¹, 王光普¹, 刘彤^{2*}

(1 天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052; 2 中新药业达仁堂制药厂, 天津 300052)

摘要:目的 观察生血丸对⁶⁰Co 合并环磷酰胺致骨髓抑制小鼠造血功能的影响, 探讨该方促进全血细胞上调的作用机制。方法 通过全自动血细胞分析仪检测外周血象; 流式细胞术检测骨髓细胞细胞周期; ELISA (酶联免疫吸附法) 检测骨髓基质中红细胞生成素(EPO)、血小板生成素(TPO)、粒细胞生长因子(G-CSF)的量。结果 生血丸能明显改善骨髓抑制小鼠外周血中白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HB)、血小板计数(PLT)、骨髓有核细胞(BMC)的量($P < 0.05$), 生血丸组升红细胞疗效更为突出($P < 0.05$); 生血丸组能解除G₀/G₁期细胞阻滞, 促进G₀/G₁期细胞进入增殖周期; 生血丸能有效平衡微环境中TPO的量; 能改善EPO的表达; 对骨髓抑制小鼠骨髓细胞上清中G-CSF有明显的正调控作用。结论 生血丸能提高骨髓抑制小鼠外周血细胞和骨髓有核细胞计数; 可促进骨髓抑制小鼠骨髓细胞从G₀/G₁期进入增殖周期; 并能有效调节骨髓微环境中TPO、EPO和G-CSF的表达, 从而促进骨髓抑制小鼠的造血功能。

关键词: 生血丸; 骨髓抑制; 造血功能; 红细胞生成素(EPO)

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1853-04

生血丸源于中医研究院广安门医院名老中医谢海洲教授数十年临床之验方。方中有鹿茸、黄柏、山药、炒白术、桑枝、白扁豆、稻芽、紫河车, 具有补肾健脾、填精补髓之功效。主药鹿茸温肾壮阳、强筋健骨、生精益血, 是峻补元阳之要药, 用于治疗精血两亏, 活血又补血, 具有促进造血之功能; 紫河车益气、养血、补精, 有强壮作用; 白术、山药为健脾开胃之品, 于大补之中防滋腻, 有益气生血之作用; 黄柏为泻火滋阴、清解清泻之品, 取其缓解滋补过峻之作用

而有利于体内吸收, 该方组方严谨, 临床应用功效确切。本实验拟从造血干细胞的增殖状况、造血微环境的变化来探讨生血丸的作用机制。

1 材料

1.1 动物: 雄性 BalB/C 小鼠, 中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 体质量(20 \pm 2)g, 8~12 周龄, 许可证号 SCXK-(军) 2007-004。

1.2 仪器: ST-360 型酶标仪, 湖北中盛千湖科技有限公司; EPICS XL 型流式细胞仪, 美国 BECK-

①收稿日期: 2010-04-23

作者简介: 严苏纯(1967-), 女, 江苏人, 副教授, 博士, 研究方向为中医药对造血的调控。

Tel: 13207607682 E-mail: d2004012@163.com

MAN-COULTER 公司; MCD-15A 型 CO₂ 培育箱, 日本 SANYO 公司; CX-10 型倒置相差显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.3 药品与试剂: 重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子 (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 华北制药金坦生物技术股份有限公司; 碘化丙啶 (PI) 染色试剂盒, 凯基生物科技有限公司; 小鼠红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) ELISA Kit, Boatman Biotech; 小鼠粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) ELISA Kit, Boatman Biotech; 小鼠血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) ELISA Kit, Boatman Biotech; 生血丸干粉 (用液相色谱检测, 本品含黄柏以盐酸小檗碱计, 不得少于 0.20 mg/g), 中新药业达仁堂制药厂提供。

2 方法

2.1 骨髓抑制小鼠动物模型的制备: 骨髓抑制小鼠模型的制备是本课题组经过反复实验论证、比较各种造模方法而制定的方案^[1]。具体方法如下: 小鼠经 2.0 Gy ⁶⁰Co 全身照射后的第 4 天开始 ip 环磷酰胺 (CTX) 50 mg/kg (于临用前配制), 每天注射 1 次, 连续给药 3 d 完成模型制备。

2.2 动物分组及给药: 将实验动物随机分为 4 组: 生血丸组、模型组、对照组、阳性药组 (GM-CSF)。除对照组外, 其他 3 组均进行造模。小鼠造模完成后 24 h 开始给药, 生血丸组每只小鼠按 10 g/kg (相当于临床人用剂量的 20 倍) 的剂量, 每天 ig 给药。对照组和模型组 ig 等量生理盐水, 阳性药组 ip GM-CSF 125 μg/kg, 连续 7 d。

2.3 外周血细胞计数: 末次给药后 24 h, 经小鼠眼球后静脉丛采血 20 μL, 抗凝稀释后用全自动血细胞分析仪进行血常规及其分类检测。

2.4 骨髓有核细胞悬液的制备: 末次给药后 24 h, 颈椎脱臼处死各组小鼠, 取出股骨, 用 6 号针头以 1 mL 生理盐水液冲出骨髓细胞, 4 号针头滤过制成单个骨髓细胞悬液。取部分骨髓细胞悬液在显微镜下

按白细胞计数法进行骨髓有核细胞 (BMC) 计数。

2.5 细胞周期样品制备及分析: 在给药 7 d 后 24 h 分别取各组动物的股骨, 参照 2.4 项方法制备骨髓有核细胞悬液。将单个骨髓细胞悬液离心 (1 000 r/min, 5 min), 去上清, 用 PBS 洗涤 2 次, 弃上清液, 滴入 70% 冷乙醇固定打散细胞, 再用 PBS 洗 2 次, 加 100 μL PBS 混匀, 加 PI 染液 (4 °C, 避光 30 min), 上流式细胞仪检测细胞周期的变化。

2.6 双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测骨髓有核细胞上清中的 EPO、TPO、G-CSF 水平: 末次给药 24 h 分别取各组动物的股骨, 制备骨髓有核细胞悬液。将单个骨髓细胞悬液离心 (1 000 r/min, 5 min), 保留上清, 按照试剂盒说明操作, 酶标仪在 492 nm 处测吸光度值。

2.7 统计学方法: 实验所得数据用 SPSS 11.5 软件统计, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据进行方差齐性检验, 同时进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 生血丸对骨髓抑制小鼠外周血及骨髓有核细胞计数的影响: 实验结果显示模型组与对照组相比, 血中白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC)、血红蛋白 (HB)、血小板计数 (PLT)、BMC 的数量明显减少, 证明造模是成功的。生血丸组、阳性药组均能明显改善骨髓抑制小鼠外周血中 WBC、RBC、HB、PLT、BMC 的量 ($P < 0.05$), 生血丸组提高 RBC 数量疗效更为突出, 与阳性药组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 生血丸对骨髓抑制小鼠骨髓细胞细胞周期的影响: 实验结果显示造模后骨髓细胞细胞周期出现了停滞的状态, G₀/G₁ 期细胞堆积, G₂/M 期和 S 期细胞明显减少。生血丸组和阳性药组均能解除 G₀/G₁ 期细胞阻滞, 促进 G₀/G₁ 期细胞进入增殖周期, 不断生成各类血细胞, 并且两组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

3.3 生血丸对骨髓抑制小鼠造血微环境中 EPO、TPO、G-CSF 表达的影响: 实验结果显示生血丸组、

表 1 生血丸对骨髓抑制小鼠外周血及骨髓有核细胞计数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of Shengxue Pill on peripheral blood and bone marrow nucleated cell of myelosuppression mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	WBC/(× 10 ⁹ · L ⁻¹)	RBC/(× 10 ¹² · L ⁻¹)	HB/(× 10 ⁹ · L ⁻¹)	PLT/(× 10 ⁹ · L ⁻¹)	BMC/(× 10 ⁹ · L ⁻¹)
对照	-	8.26 ± 4.52	10.77 ± 2.18	154.83 ± 7.35	287.16 ± 36.42	10.66 ± 1.03
模型	-	1.18 ± 0.25*	2.83 ± 1.46*	84.73 ± 40.86*	163.66 ± 38.37*	2.16 ± 1.16*
生血丸	10	5.52 ± 1.06 [△]	8.38 ± 1.58 ^{△▲}	137.33 ± 19.41 [△]	244.66 ± 37.36 [△]	8.33 ± 2.58 [△]
GM-CSF	1.25 × 10 ⁻⁴	7.80 ± 1.83 [△]	5.69 ± 0.59 [△]	137.50 ± 5.35 [△]	259.00 ± 61.77 [△]	7.17 ± 2.63 [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$; 与阳性药组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs positive group

表 2 生血丸对骨髓抑制小鼠骨髓细胞细胞周期的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of Shengxue Pill on cell cycle of bone marrow nucleated cell of myelosuppression mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ ($g \cdot kg^{-1}$)	细胞周期/%		
		G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M	S 期
对照	-	56.36 ± 1.97	11.50 ± 1.49	32.31 ± 1.12
模型	-	72.21 ± 2.10*	6.56 ± 0.89*	22.03 ± 1.47*
生血丸	10	62.70 ± 1.56 [△]	9.26 ± 0.81 [△]	25.23 ± 2.38 [△]
GM-CSF	1.25 × 10 ⁻⁴	64.88 ± 2.02 [△]	8.53 ± 0.90 [△]	24.91 ± 2.33 [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

阳性药组均能明显影响骨髓基质中 TPO、EPO、G-CSF 的量。正常情况下,骨髓基质中只有很少量的细胞因子。受造模的损害,骨髓基质中 EPO、TPO 的量急剧增加,和对照组相比有明显的差异 ($P < 0.05$)。随着药物的应用,微环境中的细胞因子量会逐渐回落,渐趋于正常。在对 TPO 的影响中可以看到,生血丸组及阳性药组均能有效平衡微环境中 TPO 的量,两组之间比较无显著差异;对 EPO 的影响显示,两组均能改善 EPO 的表达,生血丸组疗效有更佳的趋势;在对 G-CSF 的影响中,两组对骨髓抑制小鼠骨髓细胞上清中 G-CSF 均有明显的正调控作用,两组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 生血丸对骨髓抑制小鼠造血微环境中 EPO、TPO、G-CSF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of Shengxue Pill on EPO, TPO, and G-CSF in bone marrow matrix of myelosuppression mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/($g \cdot kg^{-1}$)	EPO	TPO	G-CSF
对照	-	0.104 ± 0.023	0.119 ± 0.023	0.310 ± 0.111
模型	-	0.323 ± 0.066*	0.527 ± 0.128*	0.114 ± 0.024*
生血丸	10	0.169 ± 0.050 [△]	0.219 ± 0.101 [△]	0.223 ± 0.097 [△]
GM-CSF	1.25 × 10 ⁻⁴	0.192 ± 0.021 [△]	0.278 ± 0.174 [△]	0.262 ± 0.078 [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

4 讨论

生血丸是具有补肾健脾、填精补髓之功效的临床验方。临床广泛应用于放化疗骨髓抑制及再生障碍性贫血。血细胞均起源于骨髓产生的造血干细胞。正常情况下,大多数造血干细胞处于细胞周期的静止期(G₀期),只有不到 10% 的造血干细胞处于增殖状态,造血祖细胞尤其是早期造血祖细胞虽然有高度增殖能力,但也并非全部处于增殖周期中,而静止期的造血干细胞或祖细胞进入细胞周期依赖

于造血因子的增加和(或)造血抑制因子的减少^[2-3]。在细胞周期的不同时期(G₁、S、G₂、M 期)间,从 G₁ 期到 S 期、G₂ 期到 M 期这两个阶段正处于复杂活跃的分子水平变化时期,易受外界条件的影响,且 DNA 是辐射作用的靶分子。G₀/G₁ 和 S+G₂/M 期细胞数量比例的变化反映着细胞增殖周期状态。本实验结果表明,复合造模后小鼠的骨髓细胞中 G₀/G₁ 期细胞比例显著高于对照组。产生了 G₁ 期阻滞,即抑制了细胞从 G₁ 期进入 S 期,使 DNA 合成减少。进而使 DNA 合成的后期细胞(G₂ 期细胞)和有丝分裂期细胞(M 期细胞)减少。而生血丸组及阳性药组小鼠 G₀/G₁ 期骨髓细胞比例较模型组均显著下降。S 期和 G₂/M 期骨髓细胞比例较模型组均显著上升。因此,实验小鼠经复合造模后,外周血红细胞、白细胞、血红蛋白及骨髓有核细胞数与对照组比较均显著下降 ($P < 0.05$),证明造模成功。流式细胞术检测,进一步证实了骨髓细胞周期造模后 G₁ 期阻滞,使造血干细胞或祖细胞难以进入细胞周期,导致外周血细胞、骨髓有核细胞数下降,也是模型组体外培养各祖细胞集落产率下降的成因之一。

在成人,骨髓是最为重要的造血场所,其中造血干细胞、基质细胞及细胞外基质是骨髓造血的三大支柱,后两者是目前研究最为关注的造血微环境。造血微环境中造血调控因子协同调节造血干细胞的增殖和分化。

EPO 是生理情况下调节红系生成的主要细胞因子,主要调控红系造血干细胞的增殖、分化和成熟,早期红系祖细胞(BFU-E)的增殖受 EPO、白细胞介素-3(IL-3)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)等多种因子的调控,晚期红系祖细胞(CFU-E)则主要受 EPO 的调节。EPO 对多向祖细胞(CFU-GEMM)、巨核细胞集落生成单位(CFU-Meg)、粒-巨噬细胞集落生成单位(CFU-GM)也有一定的调控作用^[4],并可直接作用于激活的 B 细胞,促进 B 细胞增殖。提高免疫球蛋白合成。据 Hermine 等^[5]和郭平等^[6]的研究报道,正常小鼠骨髓细胞也有 EPO mRNA 的表达。EPO 通过结合到其相应受体 EPO 受体(EPOR)而起作用。对骨髓抑制小鼠骨髓基质中 EPO 的表达进行了检测,表明生血丸可平衡骨髓微环境中 EPO 的浓度,从而促进周围血红细胞的均衡产生。

TPO 主要促进巨核系祖细胞(megakaryocyte colony forming unit, CFU-MK)增殖,促进巨核细胞增殖与分化成熟,以及血小板的成熟和释放。目

前研究已表明 TPO 是体内调节血小板生成的首要调节因子,此外 TPO 还具有显著的早期造血调控作用,促进红系和巨核系在内的各系干祖细胞增殖^[7-8]。此外 TPO 还可通过其受体的吸收、灭活来调控。本研究表明,造模后骨髓抑制小鼠外周血中的血小板下降,微环境中的 TPO 上升。服用生血丸后,游离 TPO 的量逐渐下降,外周血中血小板的量也逐渐回升,达到一个血小板-TPO 的自稳状态。生血丸能明显有助于调节这种自稳状态。

粒细胞集落刺激因子(G-CSF)是由单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和内皮细胞等多种细胞分泌产生的一种重要的造血生长因子,能选择性和特异性地刺激造血干细胞向中性粒细胞的定向增殖和分化。动员造血干细胞进入外周血,并可加速粒细胞成熟,增强中性粒细胞的吞噬能力^[9],增加内皮细胞黏附受体的表达,促进白细胞黏附^[10]。中性粒细胞水平具有 G-CSF 基因剂量依赖性。本实验结果显示,生血丸能上调 G-CSF 的表达,同时解释了外周

血中白细胞数上调的原因。

参考文献:

- [1] 严苏纯,祝彼得,陈志伟.几种骨髓抑制性贫血小鼠模型比较研究[J].成都中医药大学学报,2007,30(1):31-34
- [2] 祝晓玲,祝彼得.黄芪注射液对小鼠骨髓细胞增殖周期的影响[J].中药材,2000,23(10):625-627
- [3] 刘屏,王东晓,陈若芸,等.儿茶素对骨髓细胞周期及造血生长因子基因表达的作用[J].药学学报,2004,39(6):424-428
- [4] Maxwell P H, Ferguson D J P, Nicholls L G, et al. Sites of erythropoietin production [J]. *Kidney Int*, 1997, 51: 393
- [5] Hermine O, Beru N, Pech N, et al. An autocrine role for erythropoietin in mouse hematopoietic cell differentiation [J]. *Blood*, 1991, 78: 2253-2260
- [6] 郭平,王继峰,王升启.芍药苷对放射线致血虚证小鼠骨髓 EPO 和 G-CSF 基因表达的影响[J].山东中医药大学学报,2005,29(3):236-239
- [7] Drachman J G. Role of thrombopoietin in hematopoietic stem cell and progenitor regulation [J]. *Curr Opin Hematol*, 2000, 7(3): 183
- [8] Fujiwara T, Harigae H, Kameoka J, et al. A case of familial thrombocytosis: possible role of altered thrombopoietin production [J]. *Hematol*, 2004, 76(4): 395
- [9] 冯彦斌,苑晓玲,善亚君,等. G-CSF 受体胞内区结合蛋白 COXII 的分子克隆及相互作用验证 [J]. 生命科学研究, 2004, 8(1): 15
- [10] Fuste B, Mazzara R, Escolar G, et al. Granulocyte colony stimulating factor increases expression of adhesion receptors on endothelial cells through activation of p38 MAPK [J]. *Haematologica*, 2004, 89(5): 578

复方鹿茸健骨胶囊治疗原发性骨质疏松症的 II 期临床观察

李凤才¹, 谢海泉¹, 冷向阳^{2*}

(1 白求恩医科大学制药厂,吉林 长春 130012; 2 长春中医学院附属医院,吉林 长春 130021)

骨质疏松症是一种骨量减少和骨组织显微结构受损,继而引起骨骼脆性增加和骨折危险度增高的系统性骨骼疾病,临床上常表现为疼痛,身长缩短、驼背、骨折等。其中以腰背部的疼痛最为常见,而骨折是其最严重的并发症。骨质疏松症是老年性疾病中的一种多见病、常见病,属中医的“骨痿”、“骨痹”的范畴。复方鹿茸健骨胶囊是长春中医学院附属医院骨科张文泰教授与白求恩医科大学制药厂共同研制开发的中药复方制剂,由鹿茸、制首乌、龟甲、杜仲、紫河车、当归等组成,具有补肾壮骨、活血止痛的功效,主要治疗原发性骨质疏松症(肝肾不足证)^[1]。现将其 II 期临床试验研究报道如下。

1 资料和方法

1.1 西医诊断标准:参照中国老年学学会骨质疏松委员会骨质疏松诊断标准学科组 1999 年 10 月 22 日制定的《中国人骨质疏松症建议诊断标准(第二

稿)》^[2]:必须具备全身疼痛,多以腰背疼痛为明显,轻微外伤可致骨折;或脊柱后突畸形;或骨密度减少 2 个标准差以上者。

1.2 中医诊断标准:参照《中药新药临床研究指导原则》第 3 辑中的“中药新药治疗骨质疏松症的临床研究指导原则”^[3]的评定要求制定。肝肾不足证:腰背疼痛、腰膝酸软、足跟疼痛,以及头目眩晕、耳鸣耳聋、夜尿频数等症状,舌质或偏红或淡,脉或沉细或弦细,骨质疏松症见上述证候者。

1.3 病理纳入及排除标准

1.3.1 纳入病理标准:(1)具有典型的骨质疏松症临床症状,符合骨质疏松症西医诊断标准和中医辨证属肝肾不足证者;(2)年龄在 45~70 岁者;(3)自愿作为受试对象,签署知情同意书,并能接受试验药物剂型,保证完成疗程者。

1.3.2 排除病例标准:(1)不符合上述西医诊断及

①收稿日期:2010-05-09

作者简介:李凤才(1965-),男,吉林长春人,高级工程师,主要从事新药研究与开发工作。

Tel: (0431) 85888045 E-mail: xiehaiquan2003@163.com