

生血丸促进骨髓抑制小鼠造血功能的机制研究

王光普¹, 荣子丹², 张晓乐³, 严苏纯^{1*}

1. 天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052

2. 天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂, 天津 300457

3. 天津医科大学, 天津 300070

摘要: **目的** 通过观察骨髓抑制小鼠外周血网织红细胞、造血祖/干细胞集落产率的变化, 探讨生血丸对 ^{60}Co 合并环磷酰胺致骨髓抑制小鼠的促进造血功能的作用机制。**方法** 雄性 BalB/C 小鼠随机分为对照组、模型组、生血丸组、重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子 (GM-CSF) 阳性对照组, 除对照组外, 其他 3 组小鼠以 ^{60}Co 合并环磷酰胺制备骨髓抑制模型后 24 h 开始给药, 生血丸组每天 ig 10 g/kg 的生血丸 1 mL, 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 阳性对照组 ip GM-CSF 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 连续给药 7 d。进行网织红细胞计数, 造血干祖细胞培养计数集落产率。**结果** 与模型组相比, 生血丸组、阳性对照组均能明显改善骨髓抑制小鼠外周血网织红细胞的计数 ($P < 0.05$), 生血丸组网织红细胞的形态接近对照组; 生血丸组及阳性对照组大鼠各系祖细胞集落产率均得到改善, 且两组间比较无显著差异 ($P > 0.05$)。**结论** 生血丸能提高骨髓抑制小鼠外周血网织红细胞计数, 改善各系造血祖细胞集落产率, 可能为生血丸促进骨髓抑制小鼠造血功能的部分机制。

关键词: 生血丸; 骨髓抑制; 网织红细胞; 造血干/祖细胞; 集落生成

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)06-1162-04

Mechanism of Shengxue Pills on promotion of hematopoietic function in myelosuppression mice

WANG Guang-pu¹, RONG Zi-dan², ZHANG Xiao-le³, YAN Su-chun¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

2. Darentang Pharmaceutical Factory, Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300457, China

3. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Key words: Shengxue Pills; myelosuppression; reticulocytes; hematopoietic stem/progenitor cells; clonogenicity

生血丸由鹿茸、黄柏、山药、炒白术、桑枝、白扁豆、稻芽、紫河车等组成, 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, 有增强体质作用; 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, 有利于体内吸收。该方组方严谨, 临床应用治疗放疗后全血细胞下降有确切功效。本课题组前期研究表明生血丸能促进骨髓抑制小鼠的造血功能^[1], 本实验拟从造血祖/干细胞增殖变化角度, 探讨生血丸对 ^{60}Co 合并环磷酰胺致骨髓抑制小

鼠的促进造血功能的作用机制。

1 材料

1.1 动物

雄性 BalB/C 小鼠, 200 只, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 8~12 周龄, 解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK-(军) 2007-004。

1.2 药品与试剂

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), 天津中新药业达仁堂制药厂提供。重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子 (GM-CSF), 300 $\mu\text{g}/\text{支}$, 批号 200807Y12, 重组人促红素注射液 (EPO), 3 000 U/mL, 批号 200811Y31, 均为华北制药金坦生物技术股份有限

收稿日期: 2011-09-27

作者简介: 王光普, 男, 硕士研究生, 研究方向为血液病中医治疗。E-mail: alfie4871@yahoo.com.cn

*通讯作者 严苏纯 Tel: 13207607682 E-mail: d2004012@163.com

公司产品；重组人血小板生成素注射液（TPO）：15 000 U/mL，批号 20080901，沈阳三生制药有限责任公司；重组人粒细胞刺激因子注射液（G-CSF），75 μg/支，批号 20080901，杭州九源基因工程有限公司；碘化丙锭（PI）染色试剂盒，凯基生物科技有限公司；RnaseA，天根公司；RPME 1640，北京天润善达生物科技有限责任公司；特级马血清（HS），北京元亨圣马生物技术研究所以；谷氨酰胺（L-Glu），北京百奥康生物技术有限公司；二硫代苏糖醇（DTT），联星生物技术有限公司；琼脂（Agar），Sigma 公司。

1.3 主要仪器

FACSCalibur 型流式细胞仪，BD 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。

2 方法

2.1 骨髓抑制小鼠模型的制备、分组及给药

将 200 只小鼠随机分为 4 组，对照组、模型组、生血丸组、重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子（GM-CSF）组，每组 50 只。骨髓抑制小鼠模型参考文献方法^[2]制备：小鼠经 ⁶⁰Co 2.0 Gy 全身照射 3 d，第 4 天开始 ip 环磷酰胺 50 mg/kg，每天 1 次，连续给药 3 d。小鼠造模完成后 24 h 开始给药，生血丸组按 10 g/kg 每天 ig 生血丸生理盐水溶液 1 mL，对照组和模型组每天 ig 同体积生理盐水，阳性对照组 ip GM-CSF 125 μg/kg，连续给药 7 d。

2.2 外周血网织红细胞计数及形态学观察

本次给药后，小鼠眼球后静脉丛采血，血涂片以煌焦油蓝染色，油镜下观察（×1 000），计数每 1 000 个红细胞中所含网织红细胞数（%）。

2.3 造血祖细胞培养及集落计数

在本次给药后 24 h，小鼠颈椎脱臼处死，75% 乙醇浸泡消毒，无菌条件下取出股骨，用 6 号针头以 DMEM 培养基冲出骨髓细胞，4 号针头滤过制成单个骨髓细胞（BMC）悬液。混合同组单细胞悬液，计数 BMC 并调整至所需浓度，按表 1 配制培养体系^[3-4]，进行粒系、红系和巨核系造血祖细胞培养，每个体系培养 6 孔，在 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 7 d。培养第 3 天于倒置相差显微镜下计数红系集落生成数（CFU-E），培养第 7 天分别计数红系爆增式集落生成数（BFU-E）、粒细胞巨噬细胞集落生成数（CFU-GM）和巨核细胞集落生成数（CFU-Meg）。BFU-E 以 50 个细胞以上为一个集落，

表 1 CFU-GM、CFU-Meg、BFU-E 和 CFU-E 体外培养体系的组成

Table 1 Compositon of CFU-GM, CFU-Meg, BFU-E, and CFU-E *in vitro* culture systems

体系组成	所加试剂体积 / mL		
	CFU-GM	CFU-Meg	BFU-E/CFU-E
DTT (0.7 mmol)	0.20	0.20	0.20
L-Glu (3%)	0.03	0.03	0.03
HS	0.50	0.80	0.50
GM-CSF (25 ng·mL ⁻¹)	0.30	—	—
EPO (20 U·mL ⁻¹)	—	0.10	0.10
TPO (25 ng·mL ⁻¹)	—	0.20	—
BMC	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵
RPME 1640	1.80	1.8	1.80
Agar (3%)	0.20	0.20	0.20

CFU-E 以 8~32 个细胞为一个集落，CFU-GM 以 50 个细胞以上为一个集落，CFU-Meg 以 3 个细胞以上为一个集落。

2.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 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 对骨髓抑制小鼠外周血网织红细胞计数及形态的影响

与对照组相比，模型组小鼠网织红细胞计数明显下降，红细胞总数及异型红细胞数量增多。与模型组相比，生血丸组、GM-CSF 组明显促进小鼠造血功能，网织红细胞数量大量增加，两组网织红细胞数量比较表明 GM-CSF 组疗效更好（ $P < 0.05$ ），但经细胞形态比较可见，生血丸组红细胞饱满，形态更接近对照组。结果见表 2 和图 1。

表 2 生血丸对骨髓抑制小鼠外周血网织红细胞计数的影响（ $\bar{x} \pm s, n = 6$ ）

Table 2 Effect of Shengxue Pills on reticulocyte counts in peripheral blood of myelosuppression mice（ $\bar{x} \pm s, n = 6$ ）

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	网织红细胞计数 / %
对照	—	0.021 ± 0.018
模型	—	0.009 ± 0.005*
生血丸	10	0.018 ± 0.006 [△]
GM-CSF	1.25 × 10 ⁻⁴	0.210 ± 0.008 [△]

与对照组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较：[△] $P < 0.05$ ；下表同

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group; same as below

3.2 对骨髓抑制小鼠造血祖/干细胞集落产率的影响

模型组骨髓抑制小鼠造血祖/干细胞的分化能力受到破坏,各系集落产率与对照组相比有明显减少,差异显著 ($P<0.05$)。与模型组相比,生血丸组、GM-CSF 组均能提高各系造血祖/干细胞集落产率 ($P<0.05$),但两组之间相比无明显差异 ($P>0.05$)。结果见表 3。

4 讨论

血细胞均来源于骨髓产生的造血干细胞。在骨髓中造血干细胞先分化形成各系造血定向祖细胞,然后发育成为形态上可辨认的各系幼稚细胞,并进一步成熟为具有特殊功能的各类终末血细胞如红细胞、白细胞等,最后分批释放进入血液循环。正常情况下,大多数造血干细胞处于细胞周期的静止期

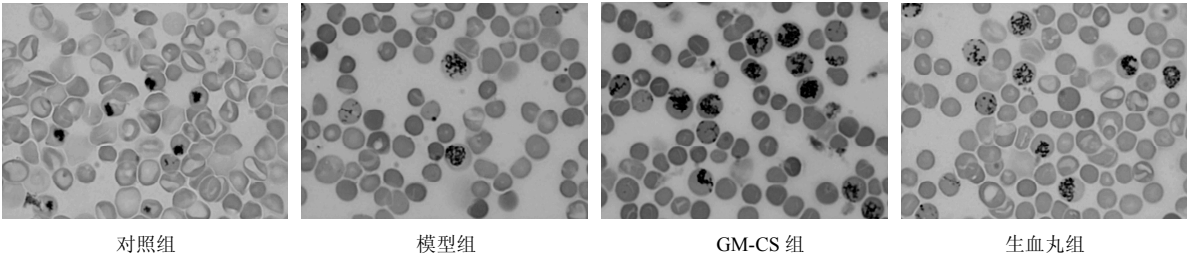


图 1 生血丸对骨髓抑制小鼠外周血网织红细胞形态的影响
Fig. 1 Effect of Shengxue Pills on reticulocyte morphous in peripheral blood of myelosuppression mice

表 3 生血丸对骨髓抑制小鼠造血干/祖细胞集落数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Shengxue Pills on cell colony of hemopoietic stem/progenitor cells in myelosuppression mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)					
组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	BFU-E	CFU-E	CFU-GM	CFU-Meg
对照	—	54.66 $\pm$ 7.22	114.16 $\pm$ 6.40	81.33 $\pm$ 8.21	85.66 $\pm$ 4.74
模型	—	26.50 $\pm$ 7.63*	64.16 $\pm$ 7.98*	20.83 $\pm$ 3.25*	36.50 $\pm$ 4.81*
生血丸	10	52.00 $\pm$ 7.58 Δ	82.50 $\pm$ 7.99 Δ	40.16 $\pm$ 6.21 Δ	58.67 $\pm$ 5.46 Δ
GM-CSF	1.25 $\times 10^{-4}$	43.83 $\pm$ 15.21 Δ	75.00 $\pm$ 7.74 Δ	35.83 $\pm$ 7.49 Δ	53.33 $\pm$ 13.36 Δ

(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,也并非全部处于增殖周期中,而静止期的造血干/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^[5]。以 ⁶⁰Co 全身照射后给予环磷酰胺制备骨髓抑制模型,造模小鼠外周血象、骨髓有核细胞数明显下降,各系祖细胞集落产率明显减少,说明模型制备成功。

补肾填髓是中医临床治疗骨髓抑制的有效方法^[6-10]。生血丸是具有补肾健脾、填精补髓功效的临床验方,明显改善骨髓抑制小鼠的造血功能,其作用靶点是多向的。前期实验研究表明生血丸可以改善骨髓抑制小鼠的造血功能,且作用机制与改变骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期有关^[1]。本实验进一步对生血丸促进造血功能的作用机制进行研究,网织红细胞计数结果显示,生血丸和 GM-CSF 均可使骨髓抑制小鼠外周血中网织红细胞数量增加,

GM-CSF 组疗效优于生血丸组 ($P<0.05$),但造血干/祖细胞形态学观察结果显示两组疗效并无明显差异。这一结果表明生血丸对骨髓细胞损伤 DNA 的修复更趋完整,对 G₀ 期造血干细胞动员的同时也兼顾到微环境的修复,因此生血丸组干/祖细胞的增殖能力与 GM-CSF 组并无明显差异;而 GM-CSF 的作用靶点在造血干细胞本身,它能促进造血干祖细胞增殖,却忽略了微环境的重建。由此可见,生血丸促进造血功能的作用是多途径、多靶点的,体现了中药复方发挥药效的整体性特点。因此中药和化学药或生物制剂对造血干细胞功能的影响及其作用机制,如细胞膜保护功能及其抗辐射能力等,尚待进一步深入研究。

参考文献

[1] 严苏纯,王光普,刘 彤. 生血丸对骨髓抑制小鼠造血功能的调控作用 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1853-1856.
[2] 严苏纯,祝彼得,陈志伟. 几种骨髓抑制性贫血小鼠模

- 型的比较研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2007, 30(1): 31-34.
- [3] 徐有恒, 王绮如. 造血生理学和造血细胞检测技术 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997.
- [4] 杜卓民. 实用组织学技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [5] 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.
- [6] 方素萍, 张新华, 吴志奎, 等. 补肾益髓法治疗中间型珠蛋白合成障碍性贫血临床研究 [J]. 医学研究杂志, 2010, 39(10): 41-43.
- [7] 杨晓文, 陈景亮, 高 敏, 等. 补肾益髓汤治疗白细胞减少症 69 例疗效观察 [J]. 新中医, 2006, 38(5): 16-17.
- [8] 吴志奎, 张新华, 柴立民, 等. 补肾益髓法治疗 β -地中海贫血 92 例临床研究 [J]. 中医杂志, 2005, 46(4): 277-279.
- [9] 陈术红, 解焕芳, 臧传国. 中西医结合治疗慢性再生障碍性贫血 30 例 [J]. 中西医结合中国民间疗法, 2011, 19(2): 52.
- [10] 张义波. 补肾益髓汤为主治疗慢性再生障碍性贫血 69 例临床观察 [J]. 中国医药指南, 2011, 9(24): 319-320.

《药物评价研究》征稿与征订启事

《药物评价研究》(原《中文科技资料目录·中草药》)杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级药学科技学术性期刊, 双月刊, 国内外公开发刊。桑国卫院士为名誉主编, 刘昌孝院士任编委会主任委员, 汤立达研究员为主编。

办刊宗旨: 报道药物评价工作实践, 推动药物评价方法研究, 开展药物评价标准或技术探讨, 促进药物评价与研究水平的提高, 为广大药物研究人员提供交流平台。

内容与栏目: 针对药物及其制剂的评价规范以及药理学评价、安全性评价、药效学评价、药物代谢动力学评价、临床评价、上市药物评价等评价研究的内容, 设置论坛、综述、方法学研究、试验研究(论著)、审评规范、国外信息、专题 7 个栏目。

读者对象: 药品管理、新药研发、药物临床应用、药学教育等相关的高等院校、科研院所、CRO 组织、生产企业、药品管理与审评机构的研究人员、管理人员、临床医生和研究生等。

本刊的创办填补了药物评价领域期刊的空白, 将为我国广大药物研究人员提供一个交流的平台, 通过交流药物评价工作的实践经验, 发展和完善评价的方法学, 探讨评价相关的国际标准或指南, 提高我国的总体评价研究水平。

欢迎广大作者积极投稿, 广大读者踊跃订阅! 本刊自办发行, 订阅请直接与编辑部联系! 本刊热忱与中外制药企业合作, 宣传推广、刊登广告(包括处方药品广告)。

本刊已正式开通网上在线投稿、审稿、查询系统, 欢迎广大读者、作者、编委使用!

《药物评价研究》编辑部

地址: 天津市南开区鞍山道 308 号 (300193) 网址: www.中草药杂志社.中国

电话/传真: 022-23006822

www.tiprpress.com (在线投稿)

E-mail: der@tiprpress.com

开户银行: 兴业银行天津南开支行

帐号: 441140100100081504

户名: 天津中草药杂志社