

## 黄芪和当归配伍对环磷酰胺所致骨髓造血功能抑制小鼠造血功能的影响

黄小平, 李 菲<sup>#</sup>, 陈凌波, 张柯胜, 邓常清\*

湖南中医药大学 分子病理实验室, 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410208

**摘要:** 目的 探讨黄芪和当归不同比例配伍对环磷酰胺(CTX)所致骨髓造血功能抑制小鼠造血功能的影响, 分析二者配伍的相互作用。方法 采用 CTX ip 复制小鼠骨髓造血功能抑制模型, 以重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)作为阳性对照药物, 药物组分别 ig 给予当归、黄芪、当归-黄芪不同比例(10:1、5:1、2.5:1、1:1、1:2.5、1:5、1:10)配伍的提取物。测定外周血象, 血清造血生长因子粒单系集落刺激因子(GM-CSF)、促红细胞生成素(EPO)、血小板生成素(TPO)的量, 计数骨髓有核细胞数(BMNC), 测定骨髓造血组织面积及脾指数(SI)。以综合指数法整合所有检测指标, 采用多重线性回归分析法分析黄芪、当归2种药物间的相互作用。结果 在连续注射 CTX 后的5~7 d, 小鼠外周血象显著降低, 同时伴有血清 GM-CSF、TPO 量降低, 骨髓 BMNC 减少, SI 升高, 骨髓造血组织面积减少。单用黄芪对外周血象、血清造血生长因子(HGF)量、骨髓造血组织面积和 BMNC 均无显著影响。单用当归可升高外周血中白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)数, 增加骨髓造血组织面积, 但能不增加血清 HGF 的量和 BMNC。黄芪-当归(5:1、2.5:1、1:1、1:2.5、1:5、1:10)配伍可升高外周血 WBC、RBC、PLT 数量, 增加 HGF 的量、BMNC 数量和骨髓造血组织面积, 降低 SI。综合效应分析表明, 黄芪-当归 1:1、1:2.5、1:5 比例配伍时发挥促进造血的作用最强。相互作用分析表明, 黄芪-当归配伍后, 当归发挥促进造血作用的重要性大于黄芪, 黄芪和当归配伍时其交互作用对药物效应的发挥产生了不可忽视的正面影响, 二者配伍对促进造血具有增效作用。结论 黄芪-当归配伍具有促进造血的作用, 当归的促进造血作用大于黄芪, 黄芪配伍当归后对促进造血具有协同增效作用, 黄芪与当归以 1:1、1:2.5、1:5 比例配伍时的促进造血作用为佳。

**关键词:** 黄芪; 当归; 配伍; 骨髓抑制; 造血; 血细胞; 造血生长因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)01-0121-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.017

## Effects of *Astragalus-Angelica* compatibility on bone marrow hematopoiesis suppression induced by Cyclophosphamide in mice

HUANG Xiao-ping, LI Fei, CHEN Ling-bo, ZHANG Ke-sheng, DENG Chang-qing

Molecular Pathology Laboratory, Key Laboratory of Hunan Province for Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Cardio-Cerebral Diseases, Key Laboratory of Hunan Universities for Cell Biology and Molecular Techniques, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of different proportion combinations of *Astragalus* and *Angelica* on bone marrow hematopoiesis suppression induced by Cyclophosphamide (CTX) in mice, and to analysis their interactions. **Methods** The model of bone marrow hematopoietic function suppression in mice was established by ip injection of CTX. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhG-CSF) was used as the positive control drug, ICR mice in the drug groups were administered with the extracts of *Astragalus*, *Angelica*, and combinations of *Astragalus* and *Angelica* with different ratios (10:1, 5:1, 2.5:1, 1:1, 1:2.5, 1:5, and 1:10). To detect peripheral hemogram, the nucleated cell count in bone marrow (BMNC), the area of bone marrow hematopoietic tissue, spleen index (SI), as well as the contents of hematopoietic growth factor (HGF) in serum such as Erythropoietin (EPO), thrombopoietin (TPO), and Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). To integrate all the

收稿日期: 2016-06-01

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(81473581); 湖南省高校科技创新团队“中西医结合防治心脑血管疾病的相关基础研究”; 湖南省自然科学基金创新群体基金“中医药防治心脑血管疾病基础研究”

**作者简介:** 黄小平(1974—), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为心脑血管疾病的防治。Tel: (0731)88458258 E-mail: jialeliu@hotmail.com

**\*通信作者** 邓常清(1963—), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为心脑血管疾病的防治。Tel: (0731)88458258 E-mail: dchangq@sohu.com

**#并列第一作者** 李 菲(1987—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为心脑血管疾病的防治。E-mail: 569229858@qq.com

test parameters using comprehensive index method, then to analyze the interaction between *Astragalus* and *Angelica* through multiple linear regression analysis. **Results** Following continuous CTX injection for 3 d, peripheral hemogram significantly decreased, accompanied by GM-CSF and TPO contents declined, BMNC reduced, SI elevated, and bone marrow hematopoietic tissue area lessened from day 5 to day 7 after injection. Single *Astragalus* had no remarkable effects on peripheral hemogram, HGF contents, bone marrow hematopoietic tissue area and BMNC. Except for HGF and BMNC, *Angelica* alone could increase the numbers of WBC, RBC, and PLT in the peripheral blood, raise the area of bone marrow hematopoietic tissue. *Astragalus* mixed *Angelica* with the ratios of 5 : 1, 2.5 : 1, 1 : 1, 1 : 2.5, 1 : 5, and 1 : 10 could increase the numbers of WBC, RBC, and PLT along with HGF content, BMNC and bone marrow hematopoietic tissue area, while decreased SI. The comprehensive effect analysis displayed that the effects of *Astragalus*-*Angelica* with 1 : 1, 1 : 2.5, and 1 : 5 ratios on promoting hematopoiesis were strongest. The interaction analysis revealed *Angelica* played a greater role in advancing hematopoiesis than *Astragalus* did after being combined, meanwhile, the interaction of *Astragalus* combined with *Angelica* produced a nonnegligible positive effect on promoting hematopoiesis, namely synergism. **Conclusion** *Astragalus*-*Angelica* compatibility has the synergism on promoting hematopoiesis, which is better when the combination ratio of *Astragalus* and *Angelica* is 1 : 1, 1 : 2.5, or 1 : 5, furthermore, the effect of *Angelica* is greater than that of *Astragalus*.

**Key words:** *Astragalus*; *Angelica*; combination; bone marrow hematopoiesis suppression; blood cells; hematopoietic growth factors

黄芪和当归是中医学防病治病常用的配伍组合,其中最常用的是黄芪-当归配伍比例为 5 : 1 的当归补血汤,具有促进造血<sup>[1]</sup>、增强免疫功能<sup>[2]</sup>、保护心血管<sup>[3]</sup>、抗脏器纤维化<sup>[4-5]</sup>、类雌激素样作用<sup>[6-7]</sup>、抗糖尿病肾病<sup>[8]</sup>等多种药理效应,可用于多种疾病的治疗。大量研究表明,当归补血汤用于多种贫血和造血功能低下治疗时具有较好的疗效。当归补血汤具有类雌激素样作用和促红细胞生成作用<sup>[9]</sup>,对小鼠骨髓造血功能抑制模型,当归补血汤汤剂和颗粒剂可促进外周血细胞和骨髓有核细胞数量的恢复,促进骨髓造血干细胞或祖细胞增殖,从而促进造血功能的恢复<sup>[10]</sup>。另有研究表明,在贫血模型中,当归-黄芪 1 : 5~5 : 1 配伍均对促进造血功能的恢复有协同作用,尤其在当归 10~40 g、黄芪 90~180 g 及当归 50~100 g、黄芪 20~100 g 表现出很强的协同作用<sup>[11]</sup>。但目前对于二者用于促进造血应当以何比例配伍众说纷纭,临床应用时配伍的比例也不一致。这影响了黄芪和当归配伍对造血功能低下治疗的应用。本课题组采用环磷酰胺致骨髓造血功能抑制小鼠模型,研究了黄芪和当归不同比例配伍对造血祖细胞增殖和骨髓细胞衰老的影响<sup>[12]</sup>,本实验从造血功能角度继续考察黄芪和当归不同配伍的促造血作用,为临床应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠,雌雄各半,体质量 18~22 g,由湖南中医药大学实验动物中心提供,合格证号 43004700005819。标准颗粒饲料饲喂,饲养于 SPF 动物实验室。动物实验得到湖南中医药大学医学动物实验伦理委员会批准。

### 1.2 药材与试剂

黄芪为豆科 (Leguminosae) 植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,产地内蒙古;当归为伞形科 (Umbelliferae) 植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,产地甘肃;药材由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供,由左亚杰教授鉴定,原植物保存于湖南中医药大学第一附属医院。按《中国药典》2015 年版收载的方法,质量鉴定以高效液相色谱法分别测定黄芪中黄芪甲苷和当归中阿魏酸的量,结果表明,以干燥品计,黄芪中黄芪甲苷的量 > 0.040%,当归中阿魏酸的量 > 0.050%,符合《中国药典》2015 年版的标准。

重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rhG-CSF, 北京双鹭药业股份有限公司,批号 13041105);注射用环磷酰胺 (CTX, 江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 13110725);小鼠促红细胞生成素 (EPO)、血小板生成素 (TPO)、粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒,武汉贝茵莱生物科技有限公司。

### 1.3 仪器

SW-CJ-IFD 型超净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司);SHEL-LAB2300 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国);TGL16 型高速冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司);IX51 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);HH-ZK1 型恒温水浴锅 (巩义市予华仪器有限责任公司);MC-300 型全自动血细胞分析仪 (深圳市美思康公司)。

## 2 方法

### 2.1 黄芪和当归提取物的制备

设立黄芪、当归、黄芪-当归不同比例 (10 : 1、

5:1、2.5:1、1:1、1:2.5、1:5、1:10) 配伍。按上述比例分别称取药材, 切碎, 水回流法提取 3 次, 第 1 次加入 8 倍量水, 加热保持沸腾提取 2 h, 冷却后倾出水提取液。后 2 次加入 6 倍量水, 加热保持沸腾提取 1 h, 冷却后倾出水提取液。合并 3 次水提液滤过, 将药液 60 ℃ 真空减压浓缩, 质量浓度分别为黄芪提取物 0.6 g/mL (生药)、当归提取物 0.3 g/mL (生药)、黄芪-当归不同比例配伍提取物 1.08 g/mL (生药)。在浓缩药液中加入 0.1% 的苯甲酸钠, 然后分装并置-4 ℃ 保存备用。

## 2.2 动物模型制备

参照文献方法<sup>[13]</sup>改良, 采用 ip CTX 的方法制备骨髓造血功能抑制模型。小鼠 ip 给予 CTX 生理盐水溶液 40 mg/kg, 连续 3 d, 对照组 ip 等量生理盐水。于注射 CTX 前及注射开始后第 1、3、5、7、9、11 天眼底静脉丛采血 50 μL, 以肝素抗凝后用全自动血液细胞分析仪测定外周血白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC)、血红蛋白 (HGB) 和血小板 (PLT) 数量, 比较两组外周血象下降和自然恢复情况。

## 2.3 分组及给药

ICR 小鼠, 按照性别、体质量分层后随机分为 12 组, 即对照组、模型组、rhG-CSF (45 μg/kg) 对照组、黄芪 (6 g/kg) 组、当归 (3 g/kg) 组、黄芪-当归 (10:1, 黄芪 9.8 g/kg+当归 0.98 g/kg) 组、黄芪-当归 (5:1, 黄芪 9 g/kg+当归 1.8 g/kg) 组、黄芪-当归 (2.5:1, 黄芪 7.71 g/kg+当归 3.08 g/kg) 组、黄芪-当归 (1:1, 黄芪 5.4 g/kg+当归 5.4 g/kg) 组、黄芪-当归 (1:2.5, 黄芪 3.08 g/kg+当归 7.71 g/kg) 组、黄芪-当归 (1:5, 黄芪 1.8 g/kg+当归 9 g/kg) 组、黄芪-当归 (1:10, 黄芪 0.98 g/kg+当归 9.81 g/kg) 组。动物适应性饲养 5 d 后, 对照组每天 ig 给予生理盐水 (10 mL/kg), 连续 8 d。模型组同上, 每天 ig 给予生理盐水共 8 d, 并在开始给予生理盐水的第 4 天起 ip 给予 CTX (40 mg/kg), 连续 3 d。各给药组每天 ig 给予不同的中药提取物, 共 8 d, 于开始给药的第 4 天起 ip 给予 CTX 连续 3 d。rhG-CSF 对照组每天 ig 给予生理盐水共 8 d, 于开始给予生理盐水的第 4 天起 ip 给予 CTX (40 mg/kg), 连续 3 d, 第 6 天起 sc 给予 rhG-CSF, 连续 3 d。各组动物在第 9 天处死并检测。

## 2.4 检测指标

**2.4.1 外周血象测定** 于末次给药后 24 h 眼底静脉丛采血 50 μL, 以肝素抗凝后用全自动血液细胞分

析仪检测外周血中的 WBC、RBC、HGB、PLT。

**2.4.2 血清 EPO、TPO、GM-CSF 测定** 末次给药后 24 h 眼底静脉丛取血 1 mL, 3 000 r/min 离心 10 min 取血清。按 ELISA 法测定血清 EPO、TPO、GM-CSF 水平, 操作按说明书进行。

**2.4.3 脾指数 (SI) 计算** 末次给药后 24 h 处死小鼠取脾脏, 除去表面结缔组织并用滤纸吸干表面血液, 迅速称质量, 计算脾指数 (SI=脾脏质量/体质量)。

**2.4.4 骨髓有核细胞 (BMNC) 计数** 取右侧股骨, 用 1 mL PBS 充分冲洗骨髓腔, 制成细胞悬液, 取 20 μL 细胞液, 用 2% 冰醋酸溶液稀释 20 倍后, 按白细胞计数法计算骨髓单个核细胞数。

**2.4.5 骨髓形态学分析** 骨髓组织切片后 HE 染色, 用 Image-ProPlus 图像分析软件测定骨髓造血组织面积占骨髓腔面积的百分比。

## 2.5 统计分析方法

数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 以 SPSS 17.0 统计软件进行分析。多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐者用 SNK 检验, 方差不齐者用 Dunnett's T3 检验。各药物组的综合效应分析采用多指标综合指数法<sup>[14]</sup>, 先将各个检测指标进行单一化处理, 计算标准化值, 即标准化值=(给药组-模型组)/(对照组-模型组)。然后根据各检测指标反映造血功能的重要性并结合专家意见确定各指标的权重系数, 本实验中确定 WBC、RBC、HGB、EPO 的权重系数为 1.7, GM-CSF、PLT 和 BMNC 的权重系数为 1.1, TPO、SI 的权重系数为 0.5。各指标的权重计分=各检测指标的标准化值×权重系数, 综合效应 (总效应) 为各指标权重计分的总和, 所求得总效应值越大表明该药物发挥促造血作用越强。黄芪-当归配伍的相互作用分析, 采用多重线性回归分析方法<sup>[15]</sup>。

## 3 结果

### 3.1 CTX 诱导的骨髓造血功能抑制小鼠模型外周血象变化的特点

注射 CTX 后, 外周血象呈现逐步下降趋势并经一定时间后自主恢复。其中 WBC、RBC、PLT 在开始注射 CTX 后第 5 天左右降到最低值, HGB 在开始注射 CTX 后第 7 天左右降到最低值。外周血象各项指标在开始注射 CTX 后第 9 天, 恢复至接近正常水平。结果见图 1。根据以上实验结果, 采用连续注射 CTX 3 d 的方法制备骨髓造血功能抑制模型, 以开始注射 CTX 后第 5 天即外周血象降至最低值时作为观察时间点。

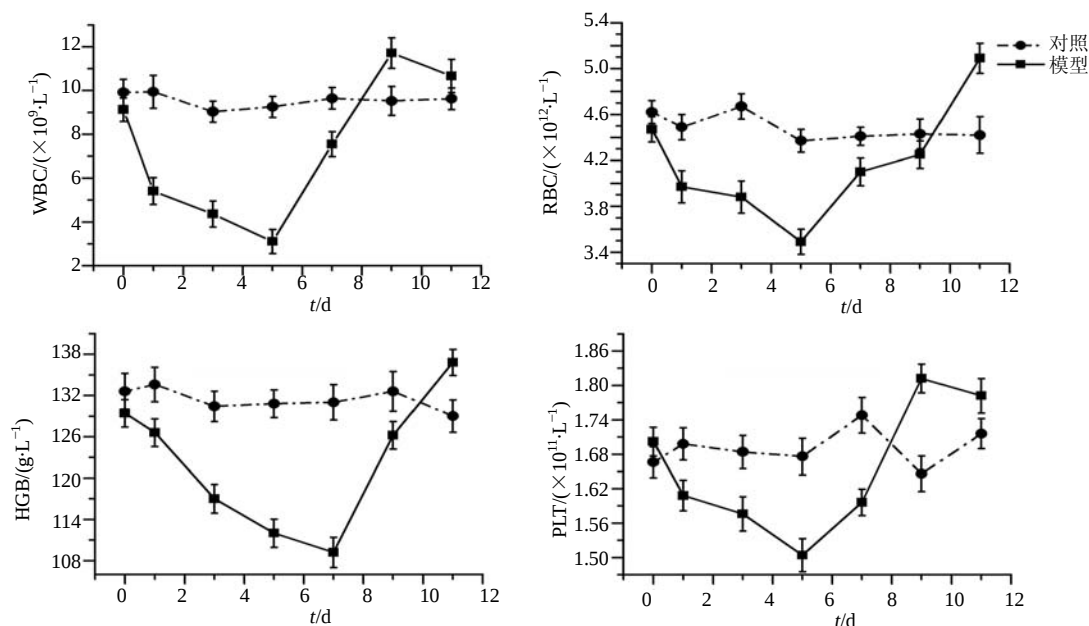


图 1 小鼠注射 CTX 后外周血象的经时变化

Fig. 1 Changes of peripheral hemogram of mice along with time followed by CTX injection

### 3.2 黄芪-当归不同比例配伍对外周血象的影响

与对照组比较, CTX 能显著降低外周血中 WBC、RBC、HGB、PLT ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。与模型组比较, rhG-CSF 对照组外周血 WBC 显著升高 ( $P < 0.01$ ), 但外周血 RBC、HGB、PLT 无显著变化。单用黄芪对降低的外周血象均无显著影响, 黄芪-当归 (10:1) 仅对降低的 RBC 有轻度促进升高的作用 ( $P < 0.05$ ), 而对外周血 WBC、HGB、PLT 无显著影响。单用当归及黄芪-当归 (5:1、2.5:1、1:1、1:2.5、1:5、1:10) 配伍对降低的 WBC、

PLT 均有促进其升高的作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。其中黄芪-当归 (1:2.5) 组 WBC 显著高于两药物单用及其他配伍组 ( $P < 0.05$ ), 黄芪-当归 (2.5:1、1:1) 配伍 PLT 升高最明显。单用当归及黄芪-当归 (5:1、2.5:1、1:1、1:2.5、1:5、1:10) 配伍对降低的 RBC 都有促进恢复的作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 其中黄芪-当归 (2.5:1) 配伍组 RBC 升高最为显著。黄芪-当归 (5:1、2.5:1、1:2.5、1:5、1:10) 配伍对降低的 HGB 有显著升高作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。结果见表 1。

表 1 各组小鼠外周血象的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 14$ )Table 1 Comparison on peripheral hemogram of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 14$ )

| 组别            | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | WBC/( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ ) | RBC/( $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$ ) | HGB/(g·L <sup>-1</sup> )   | PLT/( $\times 10^{11} \cdot L^{-1}$ ) |
|---------------|--------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| 对照            | —                        | 8.58 $\pm$ 0.66                    | 4.33 $\pm$ 0.31                       | 130 $\pm$ 7                | 1.64 $\pm$ 0.11                       |
| 模型            | —                        | 3.38 $\pm$ 0.69 <sup>▲</sup>       | 3.24 $\pm$ 0.37 <sup>▲</sup>          | 102 $\pm$ 11 <sup>▲</sup>  | 1.50 $\pm$ 0.12 <sup>▲▲</sup>         |
| rhG-CSF       | 4.5 $\times 10^{-5}$     | 10.91 $\pm$ 0.90 <sup>**</sup>     | 3.45 $\pm$ 0.44                       | 100 $\pm$ 13               | 1.55 $\pm$ 0.20                       |
| 黄芪            | 6.00                     | 3.32 $\pm$ 0.68                    | 3.49 $\pm$ 0.55                       | 97 $\pm$ 16                | 1.56 $\pm$ 0.17                       |
| 当归            | 3.00                     | 5.52 $\pm$ 0.86 <sup>**</sup>      | 3.77 $\pm$ 0.50 <sup>*</sup>          | 111 $\pm$ 11               | 1.68 $\pm$ 0.17 <sup>*</sup>          |
| 黄芪-当归 (10:1)  | 9.81 $\pm$ 0.98          | 3.26 $\pm$ 0.71                    | 3.73 $\pm$ 0.55 <sup>*</sup>          | 105 $\pm$ 7                | 1.61 $\pm$ 0.15                       |
| 黄芪-当归 (5:1)   | 9.00 $\pm$ 1.80          | 7.62 $\pm$ 1.36 <sup>**</sup>      | 4.11 $\pm$ 0.81 <sup>**</sup>         | 125 $\pm$ 6 <sup>**</sup>  | 1.64 $\pm$ 0.30 <sup>*</sup>          |
| 黄芪-当归 (2.5:1) | 7.71 $\pm$ 3.08          | 7.26 $\pm$ 0.93 <sup>**</sup>      | 4.51 $\pm$ 0.72 <sup>**</sup>         | 124 $\pm$ 18 <sup>**</sup> | 1.72 $\pm$ 0.14 <sup>**</sup>         |
| 黄芪-当归 (1:1)   | 5.40 $\pm$ 5.40          | 8.83 $\pm$ 1.12 <sup>**</sup>      | 4.25 $\pm$ 0.58 <sup>**</sup>         | 109 $\pm$ 14               | 1.63 $\pm$ 0.14 <sup>*</sup>          |
| 黄芪-当归 (1:2.5) | 3.08 $\pm$ 7.71          | 9.50 $\pm$ 1.23 <sup>**</sup>      | 4.29 $\pm$ 0.93 <sup>**</sup>         | 130 $\pm$ 12 <sup>**</sup> | 1.66 $\pm$ 0.17 <sup>*</sup>          |
| 黄芪-当归 (1:5)   | 1.80 $\pm$ 9.00          | 8.68 $\pm$ 1.80 <sup>**</sup>      | 3.93 $\pm$ 0.43 <sup>*</sup>          | 127 $\pm$ 14 <sup>**</sup> | 1.68 $\pm$ 0.17 <sup>*</sup>          |
| 黄芪-当归 (1:10)  | 0.98 $\pm$ 9.81          | 8.38 $\pm$ 1.94 <sup>**</sup>      | 3.87 $\pm$ 0.53 <sup>*</sup>          | 129 $\pm$ 15 <sup>**</sup> | 1.72 $\pm$ 0.15 <sup>**</sup>         |

与对照组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , 下同

<sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group, same as below

### 3.3 黄芪-当归不同配伍对造血生长因子、BMNC 数量及 SI 的影响

与对照组比较, CTX 能显著降低血清 GM-CSF、TPO 的量和 BMNC 数量, 升高 SI ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。与模型组比较, rhG-CSF 对照组可使血清 GM-CSF 的量和 BMNC 数量显著升高 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 但对血清 EPO、TPO 的量和 SI 无显著影响 ( $P>0.05$ )。单用黄芪仅可升高血清 EPO 的量, 而对 GM-CSF、TPO、BMNC 和 SI 无显著影响 ( $P>0.05$ )。单用当归对 GM-CSF、EPO、TPO、BMNC 和 SI 均无显著影响 ( $P>0.05$ )。黄芪和当归配伍组中, 黄芪-当归 (2.5:1、1:2.5、1:10) 配伍对降低的 TPO 具有显著的升高作用 ( $P<0.05$ )。黄芪-当归 (5:1、2.5:1、1:1、1:2.5、1:5、1:10) 配伍可显著增加 BMNC 数量、降低

SI ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。黄芪-当归 (1:1、1:2.5、1:5、1:10) 配伍可使降低的 GM-CSF 显著升高 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。除当归和黄芪-当归 (1:10) 配伍外其他各配伍组对降低的 EPO 均有升高作用 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。结果见表 2。

### 3.4 黄芪-当归不同比例配伍对骨髓形态学的影响

与对照组比较, 模型组骨髓造血组织面积显著减少 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, rhG-CSF 组骨髓造血组织面积显著增加 ( $P<0.01$ )。各药物组与模型组比较, 单用当归、黄芪-当归 (5:1、2.5:1、1:1、1:2.5、1:5、1:10) 配伍组骨髓造血组织面积显著增加 ( $P<0.01$ ), 但以上各药物组间比较差异不显著。单用黄芪及黄芪-当归 (10:1) 配伍组骨髓造血组织面积无显著变化。结果见表 3 和图 2。

表 2 各组小鼠造血生长因子水平、BMNC 计数及 SI 的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=14$ )  
Table 2 Comparison on HGF, BMNC, and SI of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=14$ )

| 组别            | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | GM-CSF/(ng·L <sup>-1</sup> ) | EPO/(U·L <sup>-1</sup> ) | TPO/(ng·mL <sup>-1</sup> ) | BMNC/(×10 <sup>12</sup> ·L <sup>-1</sup> ) | SI/(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|---------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|
| 对照            | —                        | 73.90±8.65                   | 2.03±0.42                | 2.21±0.21                  | 3.32±0.56                                  | 3.80±0.86                |
| 模型            | —                        | 61.45±8.70 <sup>▲</sup>      | 1.78±0.25                | 1.91±0.18 <sup>▲</sup>     | 2.05±0.30 <sup>▲▲</sup>                    | 4.56±0.41 <sup>▲</sup>   |
| rhG-CSF       | 4.5×10 <sup>-5</sup>     | 83.41±10.33 <sup>**</sup>    | 1.86±0.23                | 1.80±0.12                  | 2.49±0.43 <sup>*</sup>                     | 4.56±0.66                |
| 黄芪            | 6.00                     | 66.04±5.10                   | 2.41±0.50 <sup>**</sup>  | 1.84±0.23                  | 2.10±0.25                                  | 4.51±0.61                |
| 当归            | 3.00                     | 69.09±8.09                   | 2.06±0.47                | 1.86±0.30                  | 2.34±0.27                                  | 4.21±0.53                |
| 黄芪-当归 (10:1)  | 9.81+0.98                | 66.10±8.70                   | 2.16±0.28 <sup>*</sup>   | 2.04±0.24                  | 2.29±0.28                                  | 4.08±0.46                |
| 黄芪-当归 (5:1)   | 9.00+1.80                | 71.92±7.83                   | 2.08±0.33 <sup>*</sup>   | 2.11±0.32                  | 2.57±0.36 <sup>*</sup>                     | 3.89±0.62 <sup>*</sup>   |
| 黄芪-当归 (2.5:1) | 7.71+3.08                | 72.95±8.43                   | 2.19±0.49 <sup>*</sup>   | 2.20±0.21 <sup>*</sup>     | 2.71±0.42 <sup>**</sup>                    | 3.87±0.31 <sup>*</sup>   |
| 黄芪-当归 (1:1)   | 5.40+5.40                | 78.64±8.90 <sup>**</sup>     | 2.43±0.52 <sup>**</sup>  | 2.04±0.22                  | 2.82±0.33 <sup>**</sup>                    | 3.76±0.49 <sup>**</sup>  |
| 黄芪-当归 (1:2.5) | 3.08+7.71                | 81.40±12.03 <sup>*</sup>     | 2.12±0.41 <sup>*</sup>   | 2.17±0.19 <sup>*</sup>     | 2.83±0.49 <sup>**</sup>                    | 3.53±0.54 <sup>**</sup>  |
| 黄芪-当归 (1:5)   | 1.80+9.00                | 82.30±12.31 <sup>**</sup>    | 2.08±0.29 <sup>*</sup>   | 2.13±0.32                  | 3.02±0.45 <sup>**</sup>                    | 3.56±0.46 <sup>**</sup>  |
| 黄芪-当归 (1:10)  | 0.98+9.81                | 78.41±10.23 <sup>*</sup>     | 1.84±0.25                | 2.21±0.21 <sup>*</sup>     | 3.27±0.76 <sup>**</sup>                    | 3.82±0.77 <sup>*</sup>   |

表 3 各组小鼠骨髓造血组织面积的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=18$ )  
Table 3 Comparison of bone marrow hematopoietic tissue area in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=18$ )

| 组别            | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | 骨髓造血组织面积/%               |
|---------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照            | —                        | 85.51±6.33               |
| 模型            | —                        | 52.06±6.51 <sup>▲▲</sup> |
| rhG-CSF       | 4.5×10 <sup>-5</sup>     | 80.26±6.86 <sup>**</sup> |
| 黄芪            | 6.00                     | 53.00±5.59               |
| 当归            | 3.00                     | 64.76±7.10 <sup>**</sup> |
| 黄芪-当归 (10:1)  | 9.81+0.98                | 53.72±5.64               |
| 黄芪-当归 (5:1)   | 9.00+1.80                | 72.36±6.17 <sup>**</sup> |
| 黄芪-当归 (2.5:1) | 7.71+3.08                | 69.94±5.30 <sup>**</sup> |
| 黄芪-当归 (1:1)   | 5.40+5.40                | 79.92±6.23 <sup>**</sup> |
| 黄芪-当归 (1:2.5) | 3.08+7.71                | 78.18±5.14 <sup>**</sup> |
| 黄芪-当归 (1:5)   | 1.80+9.00                | 75.27±3.78 <sup>**</sup> |
| 黄芪-当归 (1:10)  | 0.98+9.81                | 76.32±6.80 <sup>**</sup> |

### 3.5 各组综合效应的比较

各组总效应比较表明黄芪-当归 (1:1、1:2.5、1:5) 配伍的总效应值最大, 黄芪-当归 (5:1、2.5:1、1:10) 配伍的总效应值次之, 单用黄芪及黄芪-当归 (10:1) 配伍的总效应值最小。说明黄芪-当归 (5:1、2.5:1、1:1、1:2.5、1:5、1:10) 配伍后发挥促进造血作用大于单用当归、单用黄芪及黄芪-当归 (10:1) 配伍, 且单用当归的药效强于单用黄芪和黄芪-当归 (10:1) 配伍。黄芪-当归 (1:1、1:2.5、1:5) 配伍时发挥造血效应最强, 单用黄芪、黄芪-当归 (10:1) 配伍无显著的促进造血作用。结果见表 4。

### 3.6 黄芪-当归配伍促进造血效应相互作用的分析

本实验对黄芪当归配伍促进造血效应的交互作用分析采用多重线性回归分析方法。通过 SPSS

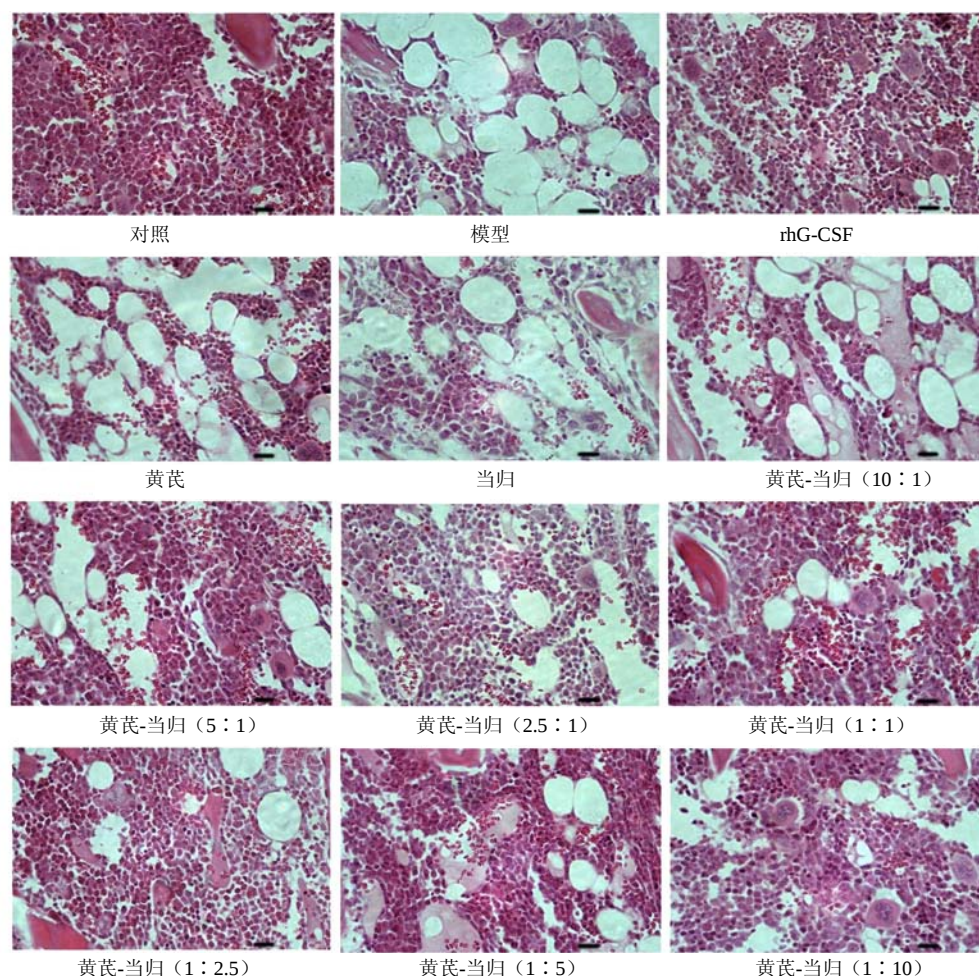


图 2 各组小鼠骨髓形态学变化

Fig. 2 Morphology changes of bone marrow of mice in each group

表 4 各组各检测指标的权重计分及总效应

Table 4 Weight score of each test index and total effect among groups

| 组别            | 权重计分   |       |        |       |        |       |        |       |       | 总效应   |
|---------------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|
|               | WBC    | RBC   | HGB    | PLT   | GM-CSF | EPO   | TPO    | BMNC  | SI    |       |
| 对照            | -0.020 | 0.390 | -0.304 | 0.471 | 0.406  | 4.284 | -0.117 | 0.043 | 0.033 | 5.19  |
| 模型            | 0.700  | 0.827 | 0.546  | 1.414 | 0.675  | 1.904 | -0.083 | 0.251 | 0.230 | 6.46  |
| rhG-CSF       | -0.039 | 0.764 | 0.182  | 0.864 | 0.411  | 2.584 | 0.217  | 0.208 | 0.316 | 5.51  |
| 黄芪            | 1.386  | 1.357 | 1.396  | 1.100 | 0.925  | 2.040 | 0.333  | 0.450 | 0.441 | 9.43  |
| 当归            | 1.268  | 1.981 | 1.336  | 1.729 | 1.016  | 2.788 | 0.483  | 0.572 | 0.454 | 9.89  |
| 黄芪-当归 (10:1)  | 1.782  | 1.575 | 0.425  | 1.021 | 1.519  | 4.420 | 0.217  | 0.667 | 0.526 | 12.15 |
| 黄芪-当归 (5:1)   | 2.001  | 1.638 | 1.700  | 1.257 | 1.763  | 2.312 | 0.433  | 0.676 | 0.678 | 12.46 |
| 黄芪-当归 (2.5:1) | 1.733  | 1.076 | 1.518  | 1.414 | 1.842  | 2.040 | 0.367  | 0.840 | 0.658 | 11.49 |
| 黄芪-当归 (1:1)   | 1.635  | 0.983 | 1.639  | 1.729 | 1.498  | 0.408 | 0.500  | 1.057 | 0.487 | 9.94  |

软件计算得出：①当不考虑黄芪当归的交互作用仅评价两药各自对于药效发挥影响力的大小时，以各组黄芪和当归的用药量为自变量，总效应为因变量进行多重线性回归分析，得到当归、黄芪的标准化偏回归系数分别为 1.060 和 0.458，说明黄芪-当归配伍后，当归发挥补血作用的重要性大于黄芪。②考虑黄芪、当

归 2 种药物的交互作用时，以各组中黄芪和当归的用药量以及交互作用数值三者为自变量，总效应为因变量进行多重线性回归分析，得到黄芪-当归配伍交互作用的标准化偏回归系数为 0.795，标准化偏回归系数为正值说明产生了正面的影响。说明黄芪和当归配伍对促进造血作用的发挥具有不可忽视的正面影响，

即黄芪和当归配伍存在增效作用。

#### 4 讨论

CTX 是具有显著细胞毒性的化疗药物,在杀灭肿瘤细胞的同时,也具有显著的骨髓抑制作用,可损伤骨髓的造血干细胞,使外周血细胞数量降低<sup>[16]</sup>。因此,常用 CTX 来造成动物骨髓造血功能抑制,研究药物对造血功能障碍的防治作用。这种模型因其易操作、造模时间短、经济实惠等特点应用普遍,但关于造模时 CTX 的用量及时间等还众说不一。因此,本实验对 CTX 诱导的小鼠骨髓造血功能抑制模型的制作方法进行了改良,发现小鼠 ip 给予 CTX 生理盐水溶液 40 mg/kg,连续 3 d,复制骨髓造血功能抑制模型较为稳定,动物存活率高(一般连用 3 d 不会引起动物死亡)。且 CTX 所致的骨髓造血功能抑制在停药后可自主恢复。因此,根据实验结果,建议采用连续注射 CTX 3 d 的方法,以开始注射 CTX 后的第 5 天左右作为观察时间点较为适宜。

中医药常用黄芪配伍当归治疗造血功能低下。但在临床上黄芪和当归用于促进造血治疗的配伍比例还众说纷纭。以往的研究表明,黄芪-当归(5:1)配伍的当归补血汤造血作用最佳。在小鼠骨髓抑制模型,当归补血汤可促进 EPO、TPO、GM-CSF 表达,促进骨髓造血干细胞/祖细胞增殖<sup>[10]</sup>。当归补血汤可刺激免疫介导的再生障碍性贫血小鼠造血祖细胞红系爆发型集落形成单位(BFU-E)、粒-巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)增殖,增加骨髓有核细胞数<sup>[17]</sup>,对免疫介导再生障碍性贫血模型小鼠有良好的治疗效果。本实验结果表明,单用黄芪对骨髓造血功能抑制小鼠无显著的促造血作用。单用当归具有一定的促造血作用,可促进外周血象的恢复,使骨髓造血组织面积增加,但对造血生长因子的量和 BMNC 数量无显著影响。推测当归可能通过促进血细胞进入外周血液而促进了外周血象的恢复,但其确切机制有待进一步阐明。在黄芪和当归不同比例配伍中,黄芪-当归(5:1、2.5:1、1:1、1:2.5、1:5、1:10)均可升高血 RBC、WBC、PLT 数,增加血中造血生长因子的量、BMNC 和骨髓造血组织面积,降低 SI,尤其是黄芪-当归(1:1、1:2.5、1:5)配伍的促造血作用最强。表明黄芪当归配伍时,发挥促造血作用的药物主要是当归,黄芪配伍当归可促进当归的促造血作用;二者配伍对骨髓造血功能抑制的促造血效应具有增效作用,其配伍比例并不是传统的黄芪-当归 5:1 配伍为最佳,

而是在 1:1、1:2.5、1:5 范围内配伍时对促进血效应具有增效作用。

研究表明,黄芪-当归 5:1 配伍的当归补血汤中的毛蕊异黄酮单独应用无明显的促红细胞生成和促成骨效应,但当当归补血汤中的毛蕊异黄酮去除则其促红细胞生成能力和促成骨效应均显著降低,提示毛蕊异黄酮对当归补血汤具有增效作用<sup>[18]</sup>。当归来源的阿魏酸对当归补血汤具有正性调节作用,可提高黄芪活性成分的溶出,增强当归补血汤的功效率<sup>[19]</sup>。阿魏酸可促进黄芪活性成分毛蕊异黄酮和芒柄花素在体外 Caco-2 细胞的通透性,促进药物吸收<sup>[20]</sup>。在失血所致的大鼠贫血模型和正常大鼠中,口服黄芪-当归 5:1 配伍的当归补血汤后,其 5 个主要化学成分阿魏酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷和黄芪甲苷在肝脏中的量显著高于其他组织,且贫血大鼠组织中这些有效成分的量显著高于正常大鼠,表明当归补血汤的这些成分可改善血虚动物的组织灌注<sup>[21]</sup>。因此,中药配伍后通过影响有效成分的溶出、药物吸收代谢及作用靶点,起到协同增效作用。本实验采用综合效应分析方法对黄芪当归配伍补血作用的分析也表明,黄芪-当归配伍后的补血作用大于单用的当归,以 1:1、1:2.5、1:5 的综合效应最强。进一步采用多重线性回归分析方法分析黄芪和当归配伍补血效应的相互作用,结果表明,黄芪当归配伍存在相互作用,二者配伍对促进造血作用的发挥具有不可忽视的正面影响,即黄芪和当归配伍存在增效作用。提示在应用黄芪和当归配伍治疗骨髓造血功能抑制时,按此比例配伍将可能取得较好的效应。推测其原因可能是二者在此比例范围配伍时,通过增加药物有效成分的溶出、促进药物吸收及作用于多靶点,发挥协同增效作用。

血细胞的生成是多能造血干细胞(HSC)在造血调控网络控制下,增殖分化成各种成熟血细胞的动态平衡过程。体内主要的造血调节因子是造血生长因子(HGF),它们刺激不同分化时期、不同类型的造血干细胞,促进其增殖分化,HGF 主要有 GM-CSF、EPO、TPO 等,造血过程即是造血细胞在多种 HGF 的调控下进行的<sup>[22]</sup>。研究表明,黄芪和当归配伍组成的当归补血汤可促进体外培养的 Hep3B 细胞表达 EPO<sup>[23]</sup>。给肾成纤维细胞 HEK293T 转染含有缺氧反应元件(HRE)的质粒,研究发现 DBT 可促进缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的表达,并促进 EPO 的表达,其作用与丝裂原活化蛋白激酶

(MAPK) 信号途径有关<sup>[24]</sup>。本研究也表明, 单用黄芪或单用当归对 HGF 的影响较小。黄芪和当归配伍可不同程度地使血中 HGF 的量增加, 提示黄芪和当归配伍促进骨髓造血功能抑制小鼠外周血象恢复的作用与其促进造血生长因子的合成和分泌, 继而促进骨髓造血干细胞和祖细胞向血细胞的增殖分化有关。因此, 促进 HGF 表达是黄芪和当归合理配伍促进造血作用的可能机制之一。

#### 参考文献

- [1] Yang X, Huang C G, Du S Y, *et al.* Effect of Danggui Buxue Tang on immune-mediated aplastic anemia bone marrow proliferation mice [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(5): 640-646.
- [2] Liu Y, Zhang H G, Li X H. A Chinese herbal decoction, Danggui Buxue Tang, improves chronic fatigue syndrome induced by food restriction and forced swimming in rat [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(12): 1825-1832.
- [3] Li Y D, Ma Y H, Zhao J X, *et al.* Protection of ultra-filtration extract from Danggui Buxue Decoction on oxidative damage in cardiomyocytes of neonatal rats and its mechanism [J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(11): 854-859.
- [4] Ke H L, Zhang Y W, Zhou B F, *et al.* Effects of Danggui Buxue Tang, a traditional Chinese herbal decoction, on high glucose-induced proliferation and expression of extracellular matrix proteins in glomerular mesangial cells [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(11): 1022-1026.
- [5] Gao J, Feng L J, Huang Y, *et al.* Total glucosides of Danggui Buxue Tang attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of extracellular matrix remodeling [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(6): 811-820.
- [6] Wang C C, Cheng K F, Lo W M, *et al.* A randomized, double-blind, multiple-dose escalation study of a Chinese herbal medicine preparation (Dang Gui Buxue Tang) for moderate to severe menopausal symptoms and quality of life in postmenopausal women [J]. *Menopause*, 2013, 20(2): 223-231.
- [7] Xie Q F, Xie J H, Dong T T, *et al.* Effect of a derived herbal recipe from an ancient Chinese formula, Danggui Buxue Tang, on ovariectomized rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(3): 567-575.
- [8] Tzeng T F, Liou S S, Liu I M. The selected traditional Chinese medicinal formulas for treating diabetic nephropathy: perspective of modern science [J]. *J Tradit Complement Med*, 2013, 3(3): 152-158.
- [9] Zhang W L, Zheng K Y, Zhu K Y, *et al.* Chemical and biological assessment of *Angelica* herbal decoction: comparison of different preparations during historical applications [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(11): 1042-1048.
- [10] Yan S, Xie Y, Zhu B, *et al.* Effect comparison of different formulation of Dang-Gui-Bu-Xue-Tang on myelosuppression mouse [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2011, 4(7): 556-559.
- [11] 史旭芹, 尚尔鑫, 唐于平, 等. 基于响应曲面分析法对当归-黄芪配伍养血补血功效相互作用研究 [J]. 药学报, 2012, 47(10): 1375-1383.
- [12] 陈凌波, 张珂胜, 黄小平, 等. 黄芪当归配伍对骨髓造血功能抑制小鼠造血祖细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4395-4400.
- [13] 田杰, 于沛, 孙文宣, 等. 环磷酸胺对正常小鼠骨髓造血细胞的影响及其作用机制 [J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(6): 1316-1321.
- [14] 马宏跃, 李伟霞, 尚尔鑫, 等. 基于抗氧化活性的不同制法当归-川芎药对配伍比例研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学杂志, 2010, 15(6): 631-635.
- [15] Sun R Y, Hu L P. Multiple linear regression analysis methods for complex random sampled data and their application [J]. *Mil Med Sci*, 2015, 39(5): 380-385.
- [16] 彭仕友, 何小解, 易著文, 等. 微囊化儿茶素对环磷酸胺致免疫低下小鼠的免疫调节作用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(21): 4123-4127.
- [17] Zhang W L, Choi R C, Zhan J Y, *et al.* Can *Hedysari Radix* replace *Astragali Radix* in Danggui Buxue Tang, a Chinese herbal decoction for woman aliment? [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(12): 1076-1081.
- [18] Gong A G, Li N, Lau K M, *et al.* Calycosin orchestrates the functions of Danggui Buxue Tang, a Chinese herbal decoction composing of *Astragali Radix* and *Angelica Sinensis Radix*: An evaluation by using calycosin-knock out herbal extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168: 150-157.
- [19] Zheng K Y, Zhang Z X, Du C Y, *et al.* Ferulic acid enhances the chemical and biological properties of astragali radix: a stimulator for danggui buxuetang, an ancient Chinese herbal decoction [J]. *Planta Med*, 2014, 80(2/3): 1591-1564.
- [20] Zheng K Y, Choi R C, Guo A J, *et al.* The membrane permeability of *Astragali Radix*-derived formononetin and calycosin is increased by *Angelica Sinensis Radix* in Caco-2 cells: a synergistic action of an ancient herbal decoction Danggui Buxue Tang [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 70(11): 671-679.
- [21] Shi X, Tang Y, Zhu H, *et al.* Comparative tissue distribution profiles of five major bio-active components in normal and blood deficiency rats after oral administration of Danggui Buxue Decoction by UPLC-TQ/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88(25): 207-215.
- [22] Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(6): 513-518.
- [23] Gao Q T, Cheung J K, Choi R C, *et al.* A Chinese herbal decoction prepared from *Radix Astragali* and *Radix Angelicae Sinensis* induces the expression of erythropoietin in cultured Hep3B cells [J]. *Planta Med*, 2008, 74(4): 392-395.
- [24] Zheng K Y, Choi R C, Xie H Q, *et al.* The expression of erythropoietin triggered by danggui buxue tang, a Chinese herbal decoction prepared from *Radix Astragali* and *Radix Angelicae Sinensis*, is mediated by the hypoxia-inducible factor in cultured HEK293T cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(1): 259-267.