

当归补血汤及其含药血清对小鼠红系造血祖细胞克隆的影响^{*}

张英华 武桂兰 姜廷良(中国中医研究院中药研究所 北京 100700)

摘要 当归补血汤水煎液不能刺激红系造血祖细胞(CFU-E)的增殖,而含药血清有促进 CFU-E 增殖的作用,随含药血清量的增加,CFU-E 克隆增殖数增高,与正常对照血清有明显差别。同法取拆方与合方口饲小鼠的含药血清,观察 CFU-E(3d)、BFU-E(7d)克隆增殖情况。各药促进 CFU-E、BFU-E 克隆增殖的平均数值顺序是黄芪血清组>归芪 1:5 血清组>归芪 1:1 血清组>当归血清组>空白小鼠血清组。

关键词 当归补血汤 含药血清 CFU-E BFU-E

Effect of Danggui Buxue Decoction and the Decoction-contained Serum on Erythroid Progenitor Cell Colony Forming Unit(CFU-E) in Mice

Zhang Yinghua, Wu Guilan, Jiang Tingliang

(Institute of Chinese Materia Media, China Academy of TCM, Beijing, 100700)

Abstract: Danggui Buxue Decoction did not directly stimulate reproduction of CFU-E in vitro, but the decoction-contained serum could have the effect with a obvious distinction compared with normal control serum. The quantity of CFU-E was promoted with increasing the serum dosage. The serum containing the separated formulae could stimulate reproduction of

^{*} 国家自然科学基金资助重点课题 No. 39630360

CFU-E, respectively. The proper sequence of the stimulating effect was as follows: Huang Qi > Danggui and Huang Qi (1 : 5) > Danggui and Huang Qi (1 : 1) > Danggui > normal control serum.

Key words: Danggui Buxue Decoction, drug-contained serum, CFU-E, BFU-E

当归补血汤的主要功效是补气生血,造血祖细胞的增生是补气生血的重要环节。本文研究了当归和黄芪伍用与单用对红系造血祖细胞集落(CFU-E)的影响,以进一步探讨当归补血汤的作用机理。

目前研究药物对造血祖细胞增殖影响的实验常在体外进行,我们曾报道在体外培养体系中直接加入中药及复方水煎液的方法导致假阴性结果,因而本文采用血清药理学体外实验方法,可能更近于真实地反映药物在体内作用的实际情况。

1 材料

1.1 受试药物 黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 购自山西浑源县,当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 购自甘肃岷县,经本所谢宗万教授鉴定。当归补血汤按归芪 1 : 5 和 1 : 1 两种配伍分别水煎两次,煎液过滤,混合浓缩;单味黄芪和单味当归同法制备成水煎液,各药液浓度均为 1.32g 饮片/ml。

1.2 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,为了获得更多血清,需要小鼠有更多的总血量,又要求动物对药物有敏感度,经试验取体重 26~32g 的小鼠为佳,北京医科大学动物科学部提供,合格证号:医动字第 01-3049。

1.3 试剂 培养基 IMDM、白细胞介素 III (IL-3) 均为美国 sigma 公司产品。促红细胞生成素(EPO),军事医学科学院放射医学所制备。植物血球凝集素(BPA),广州医药工业研究所产品,二巯基乙醇,上海试剂四厂产品。L-谷氨酰胺,上海化学试剂厂产品。甲基纤维素、二甲氧基联苯胺均购自北京试剂商店。马血清由中国军事医学科学院九所提供。

1.4 仪器 LX-64-01 型离心机(北京医

疗仪器厂), CO₂ 培养箱(日本 UAMT1P-51 型),超净工作台(北京半导体一厂)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 小鼠口饲当归补血汤等各受试药 0.1ml/10g 体重,药后 1h 小鼠吸入乙醚麻醉,无菌条件下腹主动脉取血,离心取血清,做为各受试药含药血清。

2.2 空白血清的制备 口饲小鼠与给药组等体积的水,同上法制备血清,做为空白对照血清。

2.3 小鼠造血祖细胞(红系)的获取 无菌条件下取小鼠股骨,用 IMDM 培养液冲出骨髓,用白细胞计数法计数有核细胞,调整细胞悬液中有核细胞量,使每个培养孔中的有核细胞为 0.5×10^5 个/ml。

2.4 红系祖细胞体外培养体系 一个培养体系的总体积为 2~2.5ml,其中包括 10^{-4} mol/L 二巯基乙醇 0.2ml、3% L-谷氨酰胺 0.03ml、马血清 0.5ml、EPO (10U/ml) 0.2ml、BPA 0.2ml、IL-2 0.1ml、2.7% 甲基纤维素 0.7ml,有核细胞悬液 0.2ml,受试药(或含药血清)不超过 0.4ml 用 IMDM 将体积补齐。

2.5 红系祖细胞的体外培养 将上述体系加入直径为 1.5cm 的验血皿中,每皿加 0.2ml,每 1 体系做 8 个皿,其中 4 皿培养 3d,计数红细胞系集落生成单位(CFU-E),另 4 皿培养 7d 计数红细胞系爆增型集落生成单位(BFU-E),均放入培养箱中 37℃, 5% CO₂,饱和湿度下培养。

2.6 红系集落的染色与观察 取出培养样品,每皿滴加生理盐水 2~3 滴,15min 后滴加染色工作液 3 滴,10min 后观察。染色工作液为 1% 二甲氧基联苯胺 5ml + H₂O₂ 工作

液 0.2ml, H₂O₂ 工作液为蒸馏水 0.9ml + 7.5% H₂O₂ 0.1ml。在 10×10 倍光镜下计数红色集落, CFU-E 集落大于 8 个细胞, BFU-E 集落大于 50 个细胞。每一样品取 4 个皿计数的平均数值, 每 1 试验均重复 3 次。

2.7 统计用 *t* 检验法。

祖细胞增殖提高百分率 = [受试组克隆数 - 正常组克隆数] / 正常组克隆数 × 100%。

3 结果

3.1 当归补血汤含药血清对小鼠红系细胞 (CFU-E) 克隆生长的影响 该项实验中不加外源性刺激因子, 每一培养体系中加入马血清 0.7ml, 当归补血汤、含药血清和正常血清剂量分别为 50、100、150、200μl, 总体积 2.75ml, 每一培养孔内加入有核细胞 1×10⁵ 个, 培养 3d, 计 CFU-E 数值, 重复两次, 实验结果一致, 取其均值 (表 1) 作图 1。结果表明, 当归补血汤的各剂量组对早期 (3d) 红系造血细胞均无刺激生长的作用, 正常小鼠血清内含有内源性促红系祖细胞生长的刺激因子, 随受试血清剂量增加刺激 CFU-E 活性物质的含量也增加, 但当血清量增加为 0.2ml 时其总血清含量超过体系的 30% (培养体系中还有马血清), 对 CFU-E 反而产生抑制作用。口饲小鼠当归补血汤后的含药血清对 CFU-E 有更强的刺激生长作用, 与正常对照

表 1 当归补血汤对小鼠骨髓 CFU-E 作用的量效关系

组别	50μl	100μl	150μl	200μl
空白对照血清组	100	140	128	90
13.2g/kg 血清组	170	220	216	150
19.8g/kg 血清组	260	318	322	272
原药液组	0	0	0	0

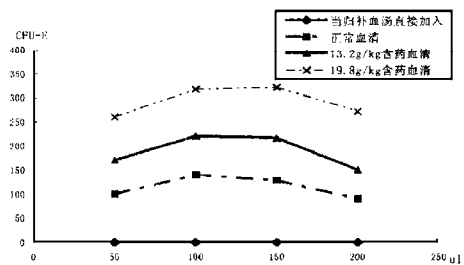


图 1 当归补血汤对小鼠骨髓 CFU-E 作用的量效关系

血清相比有明显差异, 其差值为当归补血汤经小鼠吸收、代谢后在血清中产生的活性物质的药效强度。

3.2 不同配伍的当归补血汤及其组成药味的含药血清对红系造血祖细胞克隆的影响

3.2.1 加入外源性刺激因子对 CFU-E 和 BFU-E 的影响 结果见表 2。在培养体系中加入外源生长刺激因子 EPO、BPA、IL-Ⅲ 才能激活阴性对照组 (不加任何药物或受试血清) 培养体系中红系祖细胞集落的生长, 阳性对照组 (加入正常小鼠血清 0.2ml) CFU-E 和 BFU-E 的增殖均比阴性对照组增加, 可见小鼠正常血清内含有刺激红系祖细胞增殖的内源性刺激因子。各含药血清组与正常血清组比较均有明显的刺激 CFU-E 和 BFU-E 增殖的作用。其黄芪组促进增殖作用最强, 各组的作用强度顺序为④>⑤>⑥>③>②>①。见表 2。但 4 个给药组之间并没有明显的统计学差异。从当归补血汤两组的药效作用强度分析, 似由当归、黄芪药效的相加而得 [1]。

表 2 有外源性刺激因子对红系造血祖细胞的影响

组别	CFU-E (n=6)	提高 %	BFU-E (n=6)	提高 %
阴性对照 (无受试血清) 组①	112.7±6.4		11.3±1.5	
正常血清组②	131.7±10.5		16.3±1.2	
当归血清组③	168.0±24.3	27.56	21.3±1.5 *	30.62
黄芪血清组④	214.3±14.5 **	62.72	29.0±5.0 **	77.59
归芪 1:5 血清组⑤	206.3±16.3 **	56.64	28.3±3.5 **	73.48
归芪 1:1 血清组⑥	192.3±16.6	46.07	22.3±3.2 *	36.74

注: 与正常血清组比较 * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

3.2.2 无外源性刺激因子对红系祖细胞的影响 结果见表 3, 在无外源性刺激因子的培养体系中不加任何受试血清或药物, 红系造血祖细胞不能生长增殖。加入小鼠正常血清, 红系造血祖细胞可以增殖, CFU-E 的克隆数值比 BFU-E 的大得多, 说明小鼠血清内含有 EPO 的量比 IL-Ⅲ 的量大多。而口

饲各受试药小鼠的含药血清与正常血清比较对 CFU-E 和 BFU-E 的增殖作用有明显差异,其差值为药效强度。在无外源性刺激因子的情况下,药效作用十分明显,表现在促进红系祖细胞增殖的提高百分率大多在 1 倍以上,尤以黄芪组和当归补血汤归芪 1:5 组和 1:1 组间有明显差异 $P < 0.01$, 1:5 组比 1:1 组作用明显增强。

表 3 无外源性刺激因子对红系造血祖细胞的影响

组别	CFU-E (n=6)	提高 %	BFU-E (n=6)	提高 %
阴性对照 (无受试血清)	0		0	
正常血清组	40.3±5.1		3.0±2.0	
当归血清组	78.0±21.6*	93.40	6.5±0.5*	117
黄芪血清组	108.3±25.3**	168.61	6.6±0.4**	120
归芪 1:5	107.0±20.9**	165.31	6.5±0.3**	116
归芪 1:1	67.3±6.1**	67.50	6.0±1.0**	100

注:与正常血清组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

建立半固体造血细胞集落形成技术,对研究造血细胞,研究造血调节因子及补血药物的作用机理起着关键性的作用。而这一实验技术均是通过骨髓造血祖细胞体外培养方法进行的。而血清药理学在这方面显示了较明显的优越性。

我们就当归补血汤不同配伍(归芪 1:5 和 1:1)及当归、黄芪两单味药对 CFU-E 和 BFU-E 的作用异同用血清药理学方法进行了初步研究,结果表明在体外培养体系中有

无外源性 CSF 两种情况下,等剂量的当归、黄芪、归芪 1:5 和 1:1 的含药血清与正常血清相比均能明显促进 CFU-E 和 BFU-E 的增殖,从药效强度分析,黄芪的作用最强,当归补血汤的作用似由两单味药药理作用相加而得,归芪 1:5 的作用强于 1:1 的作用,在不加外源 CSF 体系中 1:5 和 1:1 两者的药效作用有明显差异,可见对红系造血祖细胞的作用以黄芪为主,我们在先前的实验中^[2]观察到当归补血汤刺激粒系、巨系造血祖细胞增殖的作用主要源于当归,表明当归、黄芪对不同的造血祖细胞的作用各有侧重,又互相合作,共同调节机体的造血补血机能,可见其组方配伍之精良。实验结果表明当归补血汤对 BFU-E 比对 CFU-E 的作用差得多,这说明该剂在体内作用主要是促进了 EPO 的生成,可能在口服补血汤 1h 后产生促 BFU-E 增殖的 IL-Ⅲ 量还很少,当归补血汤促 IL-Ⅲ 的生成量与服药次数,服药时间长短、服药剂量有怎样的关系,当归补血汤对不同的 CSF 产生的最佳时间和最佳药物剂量仍需进一步研究,以便为临床用药提供依据。

参考文献

- 1 李仪奎. 当归、川芎的合并效应,兼论 Bürgis 式的改良运用. 中药药理与临床, 1988, 4(2): 4
- 2 张英华, 武桂兰, 姜廷良. 当归补血汤及其含组成药味的含药血清对小鼠造血祖细胞(CFU-GM)的影响. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 3

(收稿: 1999-03-05)