

四物汤对 γ 射线照射致血虚证 小鼠造血细胞作用的研究

马增春, 高月, 刘永学, 谭洪玲, 张立, 陶来宝
(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 探讨四物汤预防和治疗血虚证的作用机理。用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身照射小鼠造成血虚证模型; 荧光标记并用流式细胞仪测定 $\text{CD}34^+$ 细胞在骨髓有核细胞中的比例; 细胞固定后PI染色测定细胞周期; Annexin V-FITC试剂盒和DNA凝胶电泳检测骨髓细胞的凋亡。结果: 四物汤对小鼠骨髓造血干祖细胞、外周血细胞的恢复有明显促进作用; 有保护骨髓和促进骨髓细胞由 G_1 期进入S期的效应; 四物汤可减轻射线引起的细胞凋亡; 促进骨髓造血干祖细胞的增殖, 抑制骨髓造血干祖细胞的凋亡是四物汤预防和治疗血虚证的机制之一。

关键词: 四物汤; 血虚证; 造血; 细胞凋亡; $\text{CD}34$

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** D **文章编号:** 1005-9903(2001)03-0041-04

血虚证是中医临床常见的证候群之一, 制作血虚证动物模型的常用方法有射线照射、药物诱发和放血等。我们已成功地利用射线诱导制成实验性血虚证小鼠模型^[1], 而且进一步的研究结果表明, 血虚证小鼠 $\text{CD}34^+$ 细胞在骨髓有核细胞(BMNC)中的比例降低; 骨髓细胞凋亡; 骨髓细胞周期紊乱; 骨髓中粒系(CFU-GM)、红系(BFU-E, CFU-E)、巨核系(CFU-meg)、混合系(CFU-mix)造血祖细胞的数量下降; 外周血细胞数量下降^[2]。四物汤是治疗中医血虚证的首选药, 为临床补血、活血、调经之良方, 但其作用机理尚未阐明。本实验主要观察了四物汤对射线诱发血虚证小鼠造血系统改变的影响, 旨在探讨该药治疗血虚证的作用机理。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6L小鼠96只, 6~8周龄, 体重 $20 \pm 2\text{g}$, 雌性; 由军事医学科学院实验动物中心提供, 常规饲养。

1.2 试剂与仪器 FITC标记的大鼠抗小鼠 $\text{CD}34$ 抗体及对照抗体; Annexin V-FITC试剂盒: 均购自美国Becton Dickinson公司。碘化丙啶: Pharmingen公司产品。流式细胞仪(美国FACS Cabiur)。自动血球计数仪(日本Sysmex-800)。 γ 剂量辐射检测控制仪(军事医学科学院QT-3型优质OCL)。

1.3 药物 四物汤由熟地、当归、白芍、川芎组成,

全部药物均购自北京同仁堂中药厂, 经本所马百平教授鉴定。按《太平惠民和剂局方》规定的剂量称取组成, 熟地15g、当归10g、白芍10g、川芎6g, 共计41g/d。计算小鼠的等效剂量为 $5\text{gkg}^{-1}\text{d}^{-1}$ ^[3]。经水煎、过滤、浓缩、配制成100%药液(即每ml药液含生药1g), 置4℃保存备用。实验用50%、100%两个浓度。

1.4 模型制作 小鼠常规饲养数天适应环境后, 采用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身一次照射, 四物汤预防实验照射剂量为5.5Gy, 照射率1.30Gy/min, 照射时间为250sec, 照射距离为4m。四物汤治疗实验照射剂量为3.5Gy, 照射率1.27Gy/min, 照射时间为161sec, 照射距离为4m。

1.5 动物分组 实验分四物汤3预防和治疗两批进行, 预防实验分正常对照组、模型对照组、药物预防组($5\text{gkg}^{-1}\text{d}^{-1}$)。在模型制做前7d每只小鼠连续灌胃。治疗实验分正常对照组、模型对照组、低剂量药物治疗组($5\text{gkg}^{-1}\text{d}^{-1}$)和高剂量药物治疗组($10\text{gkg}^{-1}\text{d}^{-1}$)。模型制做后连续灌胃7d。两批实验的模型对照组和正常对照组则给予等体积生理盐水。

2 方法

2.1 外周血象检测 在给药前, 给药后1、3、5、8、10、13d, 每只实验小鼠尾静脉取血20 μl , 用Sysmex-800自动血球计数仪检测外周血象, 治疗给药后7d尾静脉取血涂片经瑞氏染色后, 在显微镜下数100个白细胞进行细胞分类。

2.2 造血祖细胞培养 小鼠造模后第7d,四物汤治疗实验每组活杀3只小鼠,按文献方法^[4]进行集落培养,检测粒系(CFU-GM)、红系(BFU-E, CFU-E)、巨核系(CFU-meg)、混合系(CFU-mix)造血祖细胞。

2.3 CD34⁺ 细胞的检测 小鼠造模后第7d、14d,用含牛血清白蛋白浓度为0.2%的PBS缓冲液冲出小鼠股骨骨髓细胞,取 1×10^6 个细胞加入30μl正常小鼠血清以封闭非特异结合位点,加入10μl FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD34 抗体,对照管加入10μl 相应对照抗体,4℃避光反应30min。加入2ml红细胞裂解液,作用5min,洗细胞两次,加入终浓度为3μg/ml的PI染液,上机检测^[5]。

2.4 细胞周期测定 小鼠造模后第7d,处死小鼠, 1×10^6 个细胞小鼠股骨骨髓细胞用70%的乙醇固定48h后,用RNA酶裂解单链核酸,加入终浓度为50μg/ml的PI染液,上机检测^[6]。

2.5 Annexin V-FITC 试剂盒检测骨髓细胞的凋亡 小鼠造模后6h、24h,用RPMI1640培养液冲洗出骨髓细胞,取 1×10^6 个细胞加入500μl标记缓冲液,混匀后取100μl细胞悬液加入测定管中,加入5μl Annexin V-FITC 和2μlPI,暗处放置15min,同时做Annexin V-FITC 和PI的对照样品管,上机检测。

2.6 骨髓、脾脏细胞DNA的提取及凝胶电泳 小鼠造模后6h、24h,处死小鼠后,迅速以PBS缓冲液冲出股骨骨髓,每个样品收集三只同组小鼠骨髓细胞;同时用注射器轻轻研磨挤出脾脏细胞,200目滤网

过滤,使成单细胞悬液,离心洗涤细胞,再悬浮于3mlPBS中。参照John等^[7]介绍的方法并稍加改动,以酚-氯仿抽提法提取细胞DNA,然后进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2.7 统计学处理 各组实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间的差异显著性分析用t检验。

3 结果

3.1 治疗给药对外周血白细胞的影响(见表1) 结果表明:3.5Gy γ射线全身一次照射后,模型对照组小鼠外周血中白细胞总数在照后3d下降到最低点,然后短暂回升后又稍下降,在照射后10d再次下降到最低点,然后再恢复。四物汤低、高剂量组在两个最低点都能明显升高外周血白细胞数,且在恢复期也能明显升高外周血白细胞数。说明四物汤低、高剂量组对血虚证小鼠外周血白细胞数量的恢复有明显的促进作用。实验表明:外周血涂片分类粒细胞、淋巴细胞、单核细胞数值各组之间无明显差异。

3.2 治疗给药对小鼠骨髓造血祖细胞的影响(见表2) 结果表明:血虚证模型对照组小鼠骨髓中的CFU-GM、CFU-E、BFU-E、CFU-meg、CFU-mix较正常对照明显减少,给予低、高剂量四物汤治疗后,小鼠骨髓中CFU-GM、CFU-E、BFU-E、CFU-mix较模型对照组明显升高。说明在3.5Gy γ射线造模后小鼠骨髓的造血功能受抑制,四物汤对CFU-GM、CFU-E、BFU-E、CFU-mix数量的回升有明显促进作用。

表1 治疗给药不同时间对3.5Gy γ射线照射小鼠白细胞总数的影响($\bar{x} \pm s$; n=12)

组别	剂量 (g/kg)	各时间点白细胞总数($10^9/L$)					
		0d	1d	3d	5d	8d	10d
正常对照	—	13.1±2.4	11.6±1.6***	12.7±2.2***	11.7±1.9***	14.5±3.9***	15.0±4.9***
模型对照	—	14.1±2.5	2.0±0.3	1.9±0.4	3.3±0.4	4.5±0.4	3.2±0.7
低剂量组	5	15.4±2.9	2.2±0.6	2.3±0.3*	3.6±0.6	5.4±0.6*	4.0±0.4*
高剂量组	10	13.4±2.2	2.0±0.3	2.3±0.3*	3.2±0.8	5.5±0.9*	4.3±0.2**

注:与模型对照比较* P<0.05. ** P<0.01. *** P<0.001(下同)

表2 治疗给药7d对3.5Gy γ射线照射小鼠骨髓造血祖细胞集落数的影响($\bar{x} \pm s$; n=3)

组别	剂量 (g/kg)	CFU-GM (个/ $10^5/MNC$)	CFU-E (个/ $10^5/MNC$)	BFU-E (个/ $10^5/MNC$)	CFU-meg (个/ $10^5/MNC$)	CFU-mix (个/ $10^5/MNC$)
正常对照	—	215.4±10.1***	147.0±14.9***	37.8±6.9***	13.8±4.0***	10.5±1.9***
模型对照	—	22.0±4.3	61.3±10.5	4.0±0.8	0.8±1.0	0.8±0.5
低剂量组	5	38.0±5.1***	107.3±9.5***	14.5±2.6***	1.0±0.8	2.8±0.5**
高剂量组	10	45.8±3.3***	114.5±18.9***	20.8±3.0***	2.3±1.9	3.8±1.3**

3.3 对血虚证小鼠骨髓中CD34⁺细胞比例的影响(见表3、4) 实验结果表明:血虚证模型对照组小

鼠骨髓中的CD34⁺细胞的比例较正常对照组明显减少,给予低、高剂量四物汤治疗后,小鼠骨髓中

CD34⁺ 细胞的比例较模型对照组明显升高。说明在 3.5Gy γ 射线造模后小鼠骨髓中的干祖细胞数量降低,四物汤对骨髓中造血干祖细胞数量的回升有明显促进作用。四物汤预防给药模型对照组小鼠骨髓中 CD34⁺ 细胞的比例较正常对照组明显减少,给予四物汤预防后,小鼠骨髓中 CD34⁺ 细胞的比例与模型对照组比较无明显变化。提前给予 5g/kg 四物汤对 5.5Gy 照射小鼠骨髓中干祖细胞数量的回升无明显影响。

表3 治疗给药不同时间对小鼠骨髓 CD34⁺ 细胞的影响($\bar{x} \pm s$; n = 6)

组别	剂量(g/kg)	7d(%)	14d(%)
正常对照	—	2.75 $\pm$ 0.16 [*]	2.59 $\pm$ 0.37 [*]
模型对照	—	1.07 $\pm$ 0.57	1.31 $\pm$ 0.60
低剂量组	5	2.01 $\pm$ 0.52 [*]	2.18 $\pm$ 0.52
高剂量组	10	2.66 $\pm$ 0.82 [*]	1.62 $\pm$ 0.08

表5 治疗给药 7d 对血虚证小鼠骨髓细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$; n = 6)

组别	剂量(g/kg)	G ₀ /1 (%)	G ₂ /M (%)	S (%)	PI (%)
正常对照	—	84.01 $\pm$ 0.83	2.00 $\pm$ 0.58 [*]	13.99 $\pm$ 0.83	15.99 $\pm$ 0.84
模型对照	—	79.54 $\pm$ 5.58	3.96 $\pm$ 0.65	16.50 $\pm$ 5.48	20.47 $\pm$ 5.58
低剂量组	5	74.99 $\pm$ 6.44	2.95 $\pm$ 0.70 [*]	24.33 $\pm$ 3.94 [*]	27.29 $\pm$ 3.60 [*]
高剂量组	10	73.49 $\pm$ 2.88	2.22 $\pm$ 1.01 [*]	24.29 $\pm$ 3.25 [*]	26.51 $\pm$ 2.88 [*]

3.5 预防给药抑制血虚证小鼠骨髓细胞的凋亡(见表6) 结果表明,5.5Gy γ 射线全身一次照射后,在照射后 6h 后,模型对照组小鼠骨髓细胞凋亡增多,提前给予四物汤后,骨髓细胞凋亡减少。说明四物汤提前给药对骨髓细胞有保护作用。用 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测骨髓细胞的凋亡带,四物汤提前给药组的 DNA Ladder 不如模型对照组明显,结果同样表明四物汤提前给药可抑制骨髓细胞的凋亡。

表6 预防给药 7d 对 5.5Gy γ 射线照射小鼠骨髓细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$; n = 12)

组别	剂量(g/kg)	6h	24h
正常对照	—	5.05 $\pm$ 0.83 [*]	5.05 $\pm$ 0.83 [*]
模型对照	—	29.22 $\pm$ 4.40	7.34 $\pm$ 0.70
药物组	5	23.05 $\pm$ 1.80 [*]	8.59 $\pm$ 1.79

4 讨论

血虚证是中医临床常见证候,多是由生血乏源、失血过多、肾精亏损、大病之后等引起。血虚证的病理研究主要集中在临床体征、血液流变学、微循环、红细胞功能、免疫功能、骨髓造血功能、及体液分子的改变等有关方面^[8]。我们对射线诱发的血虚证模型小鼠的研究结果表明:血虚证小鼠骨髓中 CD34⁺

表4 预防给药 7d 对小鼠骨髓 CD34⁺ 细胞的影响($\bar{x} \pm s$; n = 6)

组别	剂量(g/kg)	CD34 ⁺ 细胞(%)
正常对照	—	2.83 $\pm$ 0.24 [*]
模型对照	—	1.02 $\pm$ 0.69
药物组	5	1.05 $\pm$ 0.41

3.4 四物汤治疗给药对血虚证小鼠骨髓细胞周期的影响(见表5) 各组小鼠骨髓细胞主要以 G₀/1 期细胞为主,但模型组小鼠骨髓细胞在 G₂/M 阻滞,四物汤低、高剂量组在 G₂/M 阻滞的比例降低,与正常对照组无显著差异。四物汤低、高剂量组 S 期细胞增多,增殖指数(PI)增高,说明四物汤能促进骨髓细胞由 G₀/1 期进入 S 期的作用,促进骨髓细胞 DNA 的合成即促进增殖作用。

细胞的比例降低;小鼠骨髓细胞凋亡;小鼠骨髓细胞周期紊乱;小鼠骨髓中粒系(CFU-GM)、红系(BFU-E、CFU-E)、巨核系(CFU-meg)、混合系(CFU-mix)造血祖细胞的数量下降;外周血细胞数量下降。

四物汤是治疗中医血虚证的首选药,但其作用机理尚未阐明。本研究观察了四物汤对以上病理变化的影响,结果显示:1. 四物汤对血虚证小鼠外周血白细胞数量的恢复有明显的促进作用。2. 四物汤对血虚证小鼠骨髓中红系祖细胞(CFU-E、BFU-E)、粒系祖细胞(CFU-GM)、混合系祖细胞(CFU-mix)数量的回升有明显促进作用。3. 在 3.5Gy γ 射线造模后,小鼠骨髓中的干祖细胞数量降低,四物汤对血虚证小鼠骨髓中造血干祖细胞数量的回升有明显促进作用。提前给予四物汤 5g/kg 对 5.5Gy γ 射线照射小鼠骨髓中干祖细胞数量的回升无明显影响。4. 四物汤能促进血虚证小鼠骨髓细胞由 G₀/1 期进入 S 期的作用,促进骨髓细胞 DNA 的合成即促进增殖作用。5. 四物汤提前给药对血虚证小鼠骨髓细胞有保护作用,可抑制骨髓细胞的凋亡。

CD34 分子是一种高度糖基化的 I 型跨膜糖蛋白。它选择地表达于造血干细胞和造血祖细胞的表

面,随细胞的分化成熟而逐渐减弱直至消失,CD34造血细胞即包含造血干细胞和造血祖细胞^[9]。小鼠骨髓中CD34⁺细胞的比例,可反映骨髓中造血干祖细胞的数量^[10]。本实验首次以小鼠骨髓中CD34⁺细胞的比例作为评价四物汤治疗血虚证的指标,初步证明了本指标的可行性。

本实验结果提示四物汤治疗血虚证可能是通过促进骨髓造血干祖细胞的增殖,抑制骨髓造血干祖细胞的凋亡来实现的。

参考文献:

- [1] 刘永学,高月,陶来宝,等.造血细胞凋亡在射线诱发小鼠血虚证中的作用[J].深圳中西医结合杂志,2000,10:14.
- [2] 马增春,高月,刘永学,等.辐射小鼠骨髓CD34⁺细胞的变化及共意义[J].中华放射医学与防护杂志,2001,1:12.
- [3] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版

社,1996.1103.

- [4] 刘秀珍.造血祖细胞培养技术实验手册[M].北京:北京出版社,1993.25.
- [5] Morel F, Szilvassy SJ, Travis M, et al. Primitive hematopoietic cells in murine bone marrow express the CD34 antigen[J]. Blood, 1996, 88: 3374.
- [6] 沈关心.现代免疫学实验技术[M].武汉:湖北科学出版社,1999.115.
- [7] John SMW, Weitzer G, Rozen R, et al. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19: 108.
- [8] 马增春,高月.血虚证的病理研究概况[J].新中医,2000,9:60.
- [9] Knapp W, Strobl H, Scheinecker C, et al. Molecular characterization of CD34⁺ human hematopoietic progenitor cells[J]. Ann hematol, 1995, 70: 281.
- [10] Xuetao Pei. Who is hematopoietic stem cell: CD34⁺ or CD34⁻ [J]. Intern J Hematol, 1999, 70: 213.