

• 药理 •

四物汤对环磷酰胺所致血虚证 小鼠造血细胞作用的研究

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

摘要: 探讨四物汤治疗环磷酰胺所致小鼠血虚证的作用机理。腹腔注射环磷酰胺制成小鼠血虚证模型; 测定小鼠外周血象; 骨髓细胞集落形成; CD34⁺ 细胞在骨髓有核细胞中的比例; 小鼠胸腺指数。结果表明四物汤具有明显促进骨髓造血和增强免疫的作用, 并可升高血虚证小鼠的外周血象。四物汤增强免疫、促进造血可能是四物汤治疗小鼠血虚证的机理之一。

关键词: 四物汤; 血虚证; 环磷酰胺; 造血; CD34⁺

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)-05-0013-03

Effects of Siwu Tang on Medullary Hematopoiesis in Mice of Blood Deficiency Induced by Cyclophosphamide

MA Zeng-chun, GAO Yue, LIU Yong-xue, TAN Hong-ling, LU Xiao-qin, ZHANG Li
(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract: To study the effects of Siwu Tang on the mice of blood deficiency induced by cyclophosphamide, we employed the methods of circulating blood cells detection by microcellcounter, flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells by double fluorescent labeling. The results showed Siwu Tang promoted the recovery of stem and progenitor cells and circulating WBC on the blood deficient mice, and enhanced immune function. proliferative effect of Siwu Tang on bone marrow may play a key role in improvement of hematopoiesis with Siwu Tang treating blood deficient mice.

Key words: Siwu Tang; blood deficiency; cyclophosphamide; hematopoiesis; CD34⁺

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。我们已成功地利用环磷酰胺诱导制成实验性小鼠血虚证模型, 而且进一步的研究结果表明: 血虚证小鼠 CD34⁺ 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 CFU-GM、BFU-E 和 CFU-E 的生成能力减弱; 外周血细胞数量下降。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环磷酰胺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 CF57BL/6J 小鼠 75 只, 6~8 周龄, 体重

20±2g, 雌性; 由军事医学科学院实验动物中心提供, 常规饲养。

1.2 主要试剂与仪器 FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD34⁺ 抗体及对照抗体 (美国 Becton Dickinson 公司); 环磷酰胺 (上海华联); 流式细胞仪 (美国 FACS Cibur); 自动血球计数仪 (日本 Sysmex-800)。

1.3 中药 四物汤由熟地 *Radix rehmanniae*、当归 *Radix angelicae sinensis*、白芍 *Radix paeoniae alba*、川芎 *Rhizoma chuanxiong* 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。按《中药药理研究方法学》^[1] 计算小鼠的等效剂量为 5gkg⁻¹d⁻¹。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 25%、50%、100% 三个浓度。

1.3 模型制作 小鼠常规饲养数天适应环境后, 于

实验第4d按250mg/kg剂量一次腹腔注射环磷酰胺,制成血虚证模型小鼠。

1.4 实验动物分组 实验分正常对照组、模型对照组、小剂量四物汤组($5\text{gkg}^{-1}\text{d}^{-1}$)、中剂量四物汤组($10\text{gkg}^{-1}\text{d}^{-1}$)和大剂量四物汤组($20\text{gkg}^{-1}\text{d}^{-1}$)。于实验第1d等体积不同浓度灌胃,每日一次,连续灌胃13d。模型对照组和正常对照组则给予等体积的生理盐水。

2 方法

2.1 外周血象检测 在制模前,模后1、3、5、7、10、14、17、21d,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。

2.2 造血祖细胞培养 制模后第10d,每组活杀3只小鼠,按文献方法^[2]进行集落培养,检测小鼠骨髓CFU-GM、BFU-E和CFU-E的生成能力。

2.3 SD34⁺细胞的检测 制模后第10d,用含0.2%牛血清白蛋白PBS缓冲液冲出小鼠股骨骨髓细胞,取 1×10^6 个细胞加入30 μL 正常小鼠血清以封闭非特异结合位点,加入10 μL FITC标记的大鼠抗小鼠CD34⁺抗体,对照管加入10 μL 相应对照抗体,4℃避

光反应30min。加入2ml红细胞裂解液,作用5min,用PBS缓冲液洗细胞两次,加入终浓度为3 $\mu\text{g/ml}$ 的PI染液,用流式细胞仪检测^[3]。

2.4 胸腺指数检测 制模后第10d,称量小鼠体重,颈椎脱臼处死小鼠,取胸腺进行称重,计算胸腺指数。胸腺指数等于胸腺重量与相应体重之比。

2.5 统计学处理 各组实验数据以均值 $\pm$ 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 四物汤对血虚小鼠外周血象的影响 结果表明:环磷酰胺一次腹腔注射制模后,模型对照组小鼠外周血中白细胞总数在制模后3d下降到最低点,然后短暂回升后又稍下降,在模型后10d再次下降到最低点,然后再恢复。四物汤中剂量组在两个最低点都能明显升高外周血白细胞数,且四物汤在其它时间也可升高外周血中的白细胞。四物汤在模后10、17、12d可升高外周血中的红细胞,在模后5d可升高外周血中的血小板,在5、10、17d可升高外周血中的红细胞压积。可见四物汤可升高外周血中血细胞的数量,减轻环磷酰胺所致外周血象的下降。

表1 四物汤对环磷酰胺所致血虚证小鼠外周血白细胞的影响($\bar{x}\pm s$; $n=9$)

模后时间	正常组	模型组	小剂量	中剂量	大剂量
0d	15.7 $\pm$ 2.3	15.6 $\pm$ 1.8	14.4 $\pm$ 1.4	15.2 $\pm$ 2.8	15.2 $\pm$ 2.6
1d	12.8 $\pm$ 1.6*	3.2 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.7	3.3 $\pm$ 0.6
3d	13.5 $\pm$ 1.3**	1.6 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.4*	1.7 $\pm$ 0.5
5d	14.8 $\pm$ 1.7*	2.9 $\pm$ 1.1	4.3 $\pm$ 0.6**	4.9 $\pm$ 0.9**	4.6 $\pm$ 1.3**
7d	12.8 $\pm$ 1.9*	7.1 $\pm$ 1.6	10.0 $\pm$ 2.1*	9.8 $\pm$ 2.1*	10.2 $\pm$ 2.0*
10d	13.1 $\pm$ 1.9**	5.3 $\pm$ 0.9	7.1 $\pm$ 1.1*	7.1 $\pm$ 0.7**	6.5 $\pm$ 1.5
14d	14.9 $\pm$ 1.9**	5.3 $\pm$ 0.7	5.6 $\pm$ 0.9	6.0 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.9
17d	14.6 $\pm$ 0.6**	8.6 $\pm$ 1.2	9.3 $\pm$ 1.0	9.2 $\pm$ 1.7	7.6 $\pm$ 0.8
21d	16.9 $\pm$ 1.5**	8.3 $\pm$ 0.7	8.7 $\pm$ 1.0	8.7 $\pm$ 0.7	7.4 $\pm$ 0.9

注:与模型组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。(以下同)

3.2 四物汤对血虚小鼠骨髓造血祖细胞的影响(见表2) 结果表明:模型对照组小鼠骨髓CFU-GM、CFU-E和BFU-E的生成能力较正常对照明显减弱,经四物汤治疗后,小鼠骨髓中CFU-GM、CFU-E和BFU-E的生成能力较模型对照组明显增强。说明环磷酰胺造模后小鼠骨髓的造血功能受抑制,四物汤对CFU-GM、CFU-E和BFU-E的生成能力的恢复有明显促进作用。

表2 四物汤对环磷酰胺诱导血虚小鼠集落培养的影响($\bar{x}\pm s$; $n=3$)

组别	剂量(g/kg)	CFU-E	BFU-E	CFU-GM
正常对照	-	9.0 $\pm$ 1.8**	28.3 $\pm$ 3.9**	38.0 $\pm$ 5.2**
模型对照	-	1.8 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 1.0	5.0 $\pm$ 1.6
小剂量组	5	3.8 $\pm$ 1.0*	14.0 $\pm$ 6.2**	6.0 $\pm$ 2.3
中剂量组	10	3.8 $\pm$ 1.5*	26.0 $\pm$ 9.5**	13.8 $\pm$ 1.7**
大剂量组	20	1.5 $\pm$ 0.6	12.0 $\pm$ 2.7**	6.3 $\pm$ 3.2

3.3 四物汤对血虚证小鼠骨髓中CD34⁺细胞比例的影响(见表3) 实验结果表明:环磷酰胺造模后

第 10d, 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, 经四物汤治疗后, 小鼠骨髓中 CD34⁺ 细胞的比例较模型对照组明显升高。而各组小鼠骨髓有核细胞总数无明显变化。提示, 血虚证小鼠骨髓造血干祖细胞数量降低, 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。

表 3 四物汤对血虚小鼠骨髓 CD34⁺ 细胞的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)

组别	剂量 (g/kg)	有核细胞/股骨 ($\times 10^7$)	CD34 ⁺ 细胞 (%)
正常对照	-	5.59 $\pm$ 0.74	2.52 $\pm$ 0.40*
模型对照	-	4.48 $\pm$ 1.12	0.52 $\pm$ 0.11
小剂量组	5	4.66 $\pm$ 0.81	0.74 $\pm$ 0.14*
中剂量组	10	4.84 $\pm$ 0.43	0.83 $\pm$ 0.23*
大剂量组	20	4.76 $\pm$ 0.58	0.74 $\pm$ 0.05*

表 4 四物汤对血虚小鼠胸腺指数的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)

组别	剂量(g/kg)	胸腺指数(10^{-3})
正常对照	-	3.2 $\pm$ 0.4*
模型对照	-	1.7 $\pm$ 0.4
小剂量组	5	2.2 $\pm$ 0.3*
中剂量组	10	2.2 $\pm$ 0.3*
大剂量组	20	1.8 $\pm$ 0.4

3.4 四物汤对胸腺指数的影响(见表 4) 模型对照组小鼠胸腺指数比正常小鼠降低, 四物汤治疗给药可使血虚小鼠的胸腺指数增加, 提示四物汤可增强血虚小鼠的免疫功能。

4 讨论

血虚证是中医临床常见证候, 多由生血乏源、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^[4]。我们以环磷酰胺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⁺ 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 CFU-GM、BFU-E 和 CFU-E 的生成能力下降; 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环磷酰胺造成以上病理变化的影响, 结果显示: 1. 四物汤对该血虚证小鼠外周血象的恢复有明显的促进作用。2.

四物汤对血虚证小鼠骨髓 CFU-E、BFU-E 和 CFU-GM 的生成能力的恢复有明显促进作用。3. 用环磷酰胺造模后, 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。4. 四物汤可增强血虚小鼠的免疫功能, 使小鼠的胸腺指数升高。

本实验观察了三个剂量的四物汤对环磷酰胺诱发血虚证小鼠造血系统改变的影响, 结果表明中剂量的作用最明显。传统上认为中药多无毒副作用, 治疗剂量范围宽。本研究提示大剂量四物汤可能影响血虚证小鼠的胃肠功能或其它系统的功能, 一定程度上减弱其增强造血作用, 此机制尚需进一步探讨阐明。

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^[5]。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^[6]。本实验以小鼠骨髓中 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数量的恢复和增强血虚小鼠的免疫功能来实现的。

参考文献:

- [1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 1103.
- [2] 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.
- [3] Morel F, Szilvassy SJ, Travis M, et al. Primitive hematopoietic cells in murine bone marrow express the CD34⁺ antigen[J]. Blood, 1996, 88: 3374.
- [4] 马增春, 高月. 血虚证的病理研究概况[J]. 新中医, 2000, (9): 60.
- [5] Knapp W, Strobl H, Scheiencker C, et al. Molecular characterization of CD34⁺ human hematopoietic progenitor cells[J]. Ann hematol, 1995, 70: 281.
- [6] Xuetao Pei. Who is hematopoietic stem cell: CD34⁺ or CD34⁻ [J]. Intern J Hematol, 1999, 70: 213.