

补肾填精方对再生障碍性贫血大鼠模型 IL-11 及 EPO 影响的研究

秦兰¹, 陈信义², 单丽娟^{3*}, 谢荣³

(1. 新疆医科大学附属中医院血液科, 乌鲁木齐 830000;
2. 北京东直门医院血液科, 北京 100700; 3. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830054)

[摘要] 目的: 观察补肾填精方对再生障碍性贫血 (aplastic anemia, AA) 模型大鼠调控因子白细胞介素-11 (interleukin-11, IL-11) 及红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 的影响。方法: Wistar 大鼠随机分为空白对照组、模型生理盐水组、补肾填精中药组、再障生血片组共 4 组各 12 只, 对照组正常饲喂不做干预; 其他 3 组以 5-氟尿嘧啶注射液 (5-FU) 与马利兰合用诱发建立模型后, 补肾填精中药组及再障生血片组分别给予补肾填精中药 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及再障生血片混悬液 $0.015 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续 4 周, 模型组予等量生理盐水灌胃。结果: ①治疗组的白细胞 (WBC)、血红蛋白 (Hb)、红细胞 (RBC) 及血小板 (PLT) 较模型组均有不同程度增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中补肾填精中药组的 WBC 和 PLT 明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。②治疗组 IL-11 含量较模型组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。③治疗组 EPO 含量较模型组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 补肾填精方能改善模型大鼠的骨髓造血功能, 可改善细胞因子 IL-11 及 EPO 介导的分泌异常, 促进骨髓造血功能的恢复。

[关键词] 再生障碍性贫血; 补肾填精; 白细胞介素-11; 红细胞生成素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)08-0225-03

Experimental Study on IL-11 and EPO in Aplastic Anemia Rat Treated with Tonifying Kidney and Replenishing Essence Prescription.

QIN Lan¹, CHEN Xin-yi², SHAN Li-juan^{3*}, XIE Rong³

(1. Department of Hematology, Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2. Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 3. Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

[Abstract] **Objective:** To observed the effect of tonifying kidney and replenishing essence prescription (TKREP) on two regulation factors interleukin-11 (IL-11) and erythropoietin (EPO) in Aplastic Anemia (AA) rats. **Method:** Forty eight clean grade Wistar rats were randomly divided into 4 groups, namely normal control group, AA model group, TKREP group and the aplastic blood-forming tablet (ABFT) group. The normal control group was fed with normal foods and vehicle. The other three groups were given the fluorouracil (5-FU) plus Myleran to induce AA model of rat. After that, the TKREP group and ABFT group rats were fed with TKREP ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and ABFT ($0.015 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 4 weeks. While, the AA model group was fed 0.9% NaCl. **Result:** ① Compared to model group, the numbers of red blood cells and hemoglobin in treatment group were decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the numbers of white blood cells and platelet in TKREP group were significantly decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.01$); ② EPO levels were elevated in treatment group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); ③ while the IL-11 level was increased slightly, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** From

[收稿日期] 2011-11-18

[第一作者] 秦兰, 硕士, 副主任医师, 从事中西医结合血液病诊断与治疗, Tel: 13999953719, E-mail: xj13999953719@163.com

[通讯作者] * 单丽娟, 主任医师, 硕士生导师, 从事中西医结合血液病诊断与治疗, Tel: 13095022610, E-mail: sanlj@sohu.com

point view of tonifying kidney, the TKREP could significantly improve bone marrow hematopoietic function against 5-FU plus Myleran, to a certain extent, effectively improve abnormal secreting of regulation factors (IL-11 and EPO) and encouraged the bone marrow hematopoietic function's recover.

[**Key words**] anemia aplastic; tonifying kidney and v replenishing essence; IL-11; EPO

再生障碍性贫血 (aplastic anemia, AA) 是血液系统常见的疾病, 属中医“虚劳”、“血虚”、“血证”等范畴。AA 的病理机制主要是造血组织的免疫损伤。中医根据“肾主骨、生髓、藏精、精血同源”认为: 肾虚精枯是 AA 发病的关键, 补肾填精是 AA 的基本治法。在此理论的指导下, 并结合多年的临床经验自拟的补肾填精方, 临床治疗 AA, 在提升红细胞 (RBC)、白细胞 (WBC) 及血小板 (PLT) 方面具有良好疗效, 为进一步研究其作用机制, 进行了补肾填精方对 AA 模型大鼠造血功能影响的实验研究。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠, 雌性, 6~8 周龄, 体重 160~200 g, 共 48 只, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 许可证号 SCXK(新)2003-0001。

1.2 药品 马利兰片剂, 葛兰素史克威康集团生产, 批号 909227; 5-氟尿嘧啶注射液 (5-FU), 天津金耀氨基酸有限公司出品, 批号 1012162; 再障生血片, 辽源市亚东中药有限责任公司生产, 批号 Z22025856, 临用时用生理盐水配成 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 混悬液; 中药补髓填精组成: 鹿角胶 12 g, 熟地黄 12 g, 肉苁蓉 15 g, 当归 12 g, 牛膝 15 g, 陈皮 6 g。由新疆医科大学中医学院名医名方特色实验室制备, 经水煎、过滤、浓缩, 制成 100% (1 mL 含生药 1.0 g) 药液。

1.3 试剂 interleukin-1 (IL-11), erythropoietic (EPO) 酶联免疫分析试剂盒均购自上海瑞齐生物科技有限公司, 批号 201104。

1.4 仪器 CSF-820 型全自动学细胞记数分析仪 (日本光电公司), BIO-RAD 酶标仪 Xmark (美国 BIO-RAD 伯乐), KDC-2044 低速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司), IFCX-0128 型低温冰箱 (Made in Italy) 等。

2 方法

2.1 模型制备 参考文献 [1], 于大鼠腹腔注射 5-FU $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后第 5 天, 口服马利兰溶解液 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每周 1 次, 连续 3 周, 建立 AA 大鼠模型。

2.2 分组及给药 大鼠 48 只, 随机分为空白对照组、模型生理盐水组、中药治疗组 (补肾填精中药)、再障生血片对照组, 每组 12 只。以下简称对照组、模型组、补肾填精方组、生血片组。对照组正常饲喂

不予任何处理, 其余 3 组造模; 模型组于第 3 次马利兰给药 36 h 后给予生理盐水灌胃, 治疗组 (补肾填精方组与生血片组) 从第 3 次马利兰给药 36 h 后以 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$, $0.015 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 体重剂量分别灌胃补肾填精中药及再障生血片混悬液^[2], 1 次/d, 连续 4 周。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 一般体征观察 观察实验大鼠的精神活动状况、出血情况、皮毛光泽、饮食饮水量、大小便、体重变化及死亡情况。

2.3.2 对 AA 模型大鼠外周血象的影响 实验末次给药后次日每只实验大鼠尾静脉取血, 用 CSF-820 型全自动血细胞记数分析仪计数。

2.3.3 对 IL-11, EPO 含量的影响 取大鼠股静脉血 5 mL, $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后吸取上清液 2 mL, 置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱储存以备检测, IL-11, EPO 均采用酶联免疫分析法, 严格按照说明书操作。以上所有检测指标正常值均参照文献 [3]。

2.4 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件, 全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 一般体征观察 模型组大鼠从喂饲马利兰 2 周后逐渐出现精神萎靡, 眯眼, 扎堆, 进食及饮水量减少, 唇瓣灰白, 毛色变暗无光泽, 散乱竖起, 逐渐消瘦, 眼角及肛门有感染现象; 对照组大鼠活动, 进食水量均正常, 毛发光滑, 口周及四肢毛少处红润, 无上述改变; 治疗组给予补肾填精中药及再障生血片后大鼠诸症有不同程度改善, 精神较前好转, 活动量及进食量增加, 皮毛渐光泽, 体重渐回升。实验过程中, 模型生盐水组大鼠死亡 2 只, 其余 3 组正常。

3.2 补肾填精方对 AA 模型大鼠外周血象的影响 与对照组相比, 其余 3 组的 RBC, Hb, WBC 及 PLT 均有不同程度降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 治疗组的 RBC, Hb, WBC 及 PLT 均有不同程度增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中补肾填精中药组的 WBC 和 PLT 明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 治疗组间相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 补肾填精方对 AA 模型大鼠外周血象的影响

组别	n	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	WBC/ $\times 10^9/\text{L}^{-1}$	RBC/ $\times 10^{12}/\text{L}$	Hb/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	PLT/ $\times 10^9/\text{L}$
对照	12	1.7	11.04 ± 1.50	8.11 ± 1.01	145.4 ± 7.98	871.3 ± 156.15
模型	10	-	2.76 ± 0.88 ³⁾	4.17 ± 1.21 ³⁾	79.9 ± 17.06 ³⁾	204.0 ± 96.74 ³⁾
补肾填精方	12	1.0	6.21 ± 1.21 ^{3,6,7)}	5.25 ± 0.93 ^{3,4,7)}	93.7 ± 9.77 ^{3,4,7)}	358.7 ± 122.83 ^{3,5,7)}
生血片	12	0.015	4.43 ± 0.81 ^{3,5)}	4.82 ± 0.69 ^{3,4)}	86.4 ± 11.14 ^{3,4)}	279.6 ± 110.67 ^{3,4)}

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$;与模型组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.001$;与生血片组比较⁷⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 补肾填精方对 AA 模型大鼠 IL-11, EPO 含量的影响 与对照组相比,各组的 IL-11 均不同程度降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组相比,治疗组 IL-11 含量高于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);治疗组间相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组相比,各组大鼠血清 EPO 的含量明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.001$);与模型组相比,治疗组 EPO 含量低于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);治疗组间相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 2)。

表 2 补肾填精方对 AA 模型大鼠 IL-11、EPO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-11/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	EPO/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
对照	12	1.7	260.90 ± 81.30	6.49 ± 3.11
模型	10	-	139.13 ± 41.19 ³⁾	32.84 ± 10.02 ³⁾
补肾填精方	12	1.0	196.20 ± 49.66 ^{1,4,7)}	23.98 ± 10.18 ^{3,4,7)}
生血片	12	0.015	175.46 ± 63.42 ^{2,4)}	27.53 ± 7.37 ^{3,4)}

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$;与模型组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.001$;与生血片组比较⁷⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

中医认为肾为先天之本,肾主藏精,精血同源。若肾精亏虚,一方面导致肾阳不振,进而不能鼓动骨髓造血,另一方面由于肾精亏虚,虚热内生,耗损阴津,日久精枯髓竭,无以化生气血,日久可导致骨髓进行性造血功能低下或造血功能紊乱。由此可见肾虚精亏是导致气血不足、生血障碍的根本原因,并贯穿于 AA 发病过程的始终。

本实验所选药物是经过反复临床验证、对治疗 AA 有确定疗效的中药。方中重用熟地黄滋补肾阴、益精填髓;肉苁蓉甘咸温,归肾经,有补肾阳,益精血的功效;鹿角胶性咸温,功能温补肝肾益精血。辅以当归养血活血,淮牛膝补肝肾强筋骨,几药共奏补肾填精之功。

随着对 AA 免疫发病机制认识的深入,造血细胞因子的作用机制一直是近年研究的热点。相关文献报道由 T 淋巴细胞功能亢进引起的造血组织损伤及多种与造血有关的正负调控因子分泌异常,在 AA 的发生、发展及临床转归中起着重要作用^[4-5]。EPO 是一种刺激红系造血的细胞因子,主要由肾皮

质区近曲小管周围的间质细胞分泌,肝脏中枯否细胞、骨髓中巨噬细胞也可分泌,其水平除与缺氧和 Hb 的水平有关外,还与骨髓红系细胞生成的功能密切相关。IL-11 是一种多功能细胞因子,作用范围广泛。它能够协同 IL-3、干细胞因子 (SCF) 等促进原始祖细胞的增殖,协同 IL-3 促进巨核细胞的分化成熟和血小板的生成,刺激红细胞的生成,协同 SCF 促进骨髓集落细胞的生成,在造血微环境中能旁分泌和自分泌生长因子,还能够协同 PTH 刺激破骨细胞的发展,以致骨节的形成。另外 IL-11 也具有参与上皮细胞的正常生长调控,刺激海马神经祖细胞的增殖,抑制脂肪形成(故 IL-11 又称脂肪形成抑制因子),降低发热及炎症反应,调节细胞外基质代谢等作用^[6-7]。

本实验研究发现,补肾填精中药对 AA 模型大鼠有治疗作用,使造模后动物死亡率明显降低,白细胞、血红蛋白、血小板均明显上升,IL-11、TPO 造血调控因子分泌紊乱得到一定改善,骨髓造血功能得以恢复,为临床辨证论治、科学组方提供有效证据。

[参考文献]

- [1] 赵均铭,褚建新,丁顺利,等. 5-氟尿嘧啶与白消安合用诱导建立大鼠急性再生障碍性贫血模型[J]. 中华血液学杂志,2001,22(4):202.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:251.
- [3] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 成都:四川科学技术出版社,1998:180.
- [4] 邵宗鸿,袁焯. 再生障碍性贫血免疫发病机制及免疫治疗[J]. 中国实用内科杂志,2006,26(4):252.
- [5] 王鲁群,马晓星,迟翠芳,等. 抗 T 淋巴细胞单克隆抗体对再生障碍性贫血患者细胞免疫功能的调节作用[J]. 中国实验血液学杂志,1997,5(2):186.
- [6] Yonemura Y, Kawakita M, Miyake H, et al. Effects of interleukin-11 on carboplatin-induced thrombocytopenia in rats and in combination with stem cell factor [J]. Int J Hematol, 1997, 65(4):397.
- [7] Weich N S, Fitzgerald M, Wang A, et al. Recombinant human interleukin-11 synergizes with steel factor and interleukin-3 to promote directly the early stages of murinemegakaryocyte development *in vivo* [J]. Blood, 2000, 95(2):503.

[责任编辑 古云侠]