

四物汤配方颗粒对骨髓抑制小鼠造血损伤恢复作用的实验研究

陈志伟¹, 祝彼得¹, 许惠玉², 刘曾敏¹, 陈杏花¹, 秦建¹

1 成都中医药大学, 成都 (610075)

2 北京中医药大学, 北京 (100029)

E-mail: czwzp@tom.com

摘要: **目的:** 观察四物汤配方颗粒对骨髓抑制小鼠造血功能的影响。**方法:** 采用 $C_{60}\gamma$ 照射和注射环磷酸胺复合制备骨髓抑制小鼠模型。应用实验血液学、造血祖细胞培养等技术方法探讨四物汤配方颗粒对骨髓抑制小鼠外周血、骨髓有核细胞数、骨髓造血祖细胞的增殖的影响。**结果:** 四物汤配方颗粒能促进外周血、骨髓有核细胞数、骨髓造血祖细胞的增殖。

结论: 四物汤配方颗粒能促进骨髓造血功能的恢复。

关键词: 四物汤配方颗粒, 骨髓抑制

近年来, 国内、外的学者对四物汤的药理作用主要集中在免疫、血液、心血管、抗放射和抗化学药物的毒性等方面, 在中药复方现代化方面亦作了初步的探索^[1]。四物汤配方颗粒是以中药古方“四物汤”作为其剂型基础的现代中药, 采用现代工艺技术而制成。本课题拟研究颗粒对骨髓抑制小鼠造血功能的影响, 为中药的剂型改良应用提供有价值实验依据。

1. 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c 纯系雄性小鼠 50 只, 8~12 周龄, 体质量 18~22g, 成都中医药大学实验动物中心。动物在实验前适应环境 3 天后进行实验。

1.2 药物: 四物汤配方颗粒由四川绿色药业科技发展股份有限公司生产, 由我校药学院傅超美老师馈赠。

1.3 主要试剂

环磷酸胺: 上海华联制药有限公司产品, 批号: 041007; 重组人促红细胞生成素 (rhEPO): 成都地奥九泓制药厂, 批号: 20040603; 重组小鼠白细胞介素-3 (rmIL-3): PeproTech 公司, 美国, 批号: 030248; 重组小鼠粒单系集落刺激因子 (rmGM-CSF): PeproTech 公司, 美国, 批号: 030555, 重组小鼠促血小板生成素 (rmTPO): PeproTech 公司, 美国, 批号: 0702262; 重组人粒细胞集落刺激因子 (rhG-CSF): 长春金赛药业有限责任公司产品, 批号: 20050901。

1.4 主要设备

超净工作台: JJT-900/1300 型, 北京半导体设备厂; 倒置相差显微镜: CX-10型, 日本 Olympus 公司; 全自动血球分析仪: HS-18 型, 意大利; $Co^{60}\gamma$ 源: 由四川省农业科学院生物技术核技术研究所

1.5 骨髓抑制小鼠模型的制备

小鼠经 2.0Gy $^{60}Co\gamma$ 全身照射后的第4天开始腹腔注射环磷酸胺 (Cy) 40mg/kg (临用前配制)、每天注射一次, 连续注射3天完成模型制备^[2-3]。

1.6 动物分组与给药

将小鼠随机分为正常对照组、模型组、四物汤配方颗粒组、阳性对照组，每组10只。除正常对照组外，其它4组均进行造模。小鼠造模完成后24h开始给药，四物汤配方颗粒按中药药理学研究方法^[4]计算小鼠的等效剂量为5g/kg.d，灌胃0.2ml，阳性对照组腹腔注射rhG-CSF 125μg/kg，每只小鼠腹腔注射0.2ml。连续给药7天。

1.7 外周血细胞计数

在给药8天后24h，经小鼠眼球后静脉丛采血20μl，稀释后用HS-18型全自动血细胞分析仪进行血常规检测。

1.8 骨髓有核细胞悬液的制备

在给药8天后24h，颈椎脱臼处死各组小鼠，取出股骨，用6号针头以1ml生理盐水液冲出骨髓细胞，4号针头过滤制成单个骨髓细胞悬液。取部分骨髓细胞悬液在显微镜下按白细胞计数法进行骨髓有核细胞（BMC）计数。

1.9 造血祖细胞培养

在给药8天后24h，颈椎脱臼处死各组小鼠，无菌条件下取出股骨，6号针头DMEM培养基冲出骨髓细胞，4号针头过滤制成单个骨髓细胞悬液，混合同组单细胞悬液，计数BMC并调整至所需浓度，按本实验室常规培养体系做粒系、红系和巨核系三系造血祖细胞培养，每组培养6孔，在37℃、5% CO₂饱和湿度条件下培养7天。培养第3天于倒置相差显微镜下计数CFU-E细胞集落数，培养第7天分别计数早期红系祖细胞（BFU-E）、粒系祖细胞（CFU-GM）和巨核系祖细胞（CFU-Meg）集落数。BFU-E以多于50个细胞为一个集落，CFU-E以8-32个细胞为一个集落，CFU-GM以多于50个细胞为一个集落，CFU-Meg以多于3个细胞为一个集落。

1.10 统计学处理

实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组数据进行方差齐性检验，同时进行单因素方差分析。

2. 结果

2.1 四物汤配方颗粒对骨髓抑制小鼠外周血象及骨髓有核细胞的影响

由表1与正常对照组相比，模型组白细胞、红细胞、血小板和血红蛋白以及骨髓有核细胞均明显降低（ $P < 0.05$ ）。四物汤配方颗粒和阳性对照组白细胞、红细胞、血小板、和血红蛋白明显高于模型组（ $P < 0.05$ ），说明四物汤配方颗粒各组和阳性对照组对外周血和BMC的恢复有促进作用，阳性对照组的促进作用强于四物汤配方颗粒组。

表 1 四物汤配方颗粒对骨髓抑制小鼠外周血及骨髓有核细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Tab 1 Effect of siwu drugs of formula granulaon on the numbers of peripheral blood cells and bone marrow cells of myelosuppressed mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	n	WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	HB (g/L)	PLT ($\times 10^9/L$)	BMC ($\times 10^9/L$)
正常组 Normal control	10	11.42±2.34	12.34±2.74	153.64±12.92	81.34±12.53	11.34±1.67
模型组 Model group	10	1.34±0.49▲	2.18±1.35▲	101.43±13.45▲	41.25±9.34▲	2.44±0.46▲
四物汤配方颗粒组 siwu drugs of formula granulaon group	10	8.34±1.46△	10.61±1.74△	139.24±18.61△	78.23±9.45△	8.47±1.31△
阳性对照组 Positive control	10	8.82±1.34△	10.83±1.63△	121.63±12.34△	79.22±9.45△	8.79±1.29△

▲ $P < 0.05$, vs normal control; △ $P < 0.05$, vs model group;

2.2 四物汤配方颗粒对骨髓抑制小鼠造血祖细胞增殖的影响

表 2 所示, 与正常对照组相比, 模型组三系造血祖细胞集落明显减少 ($P < 0.05$)。四物汤配方颗粒和阳性对照组三系造血祖细胞集落明显高于模型组 ($P < 0.05$), 说明四物汤配方颗粒组和阳性对照组对三系造血祖细胞集落形成有明显的促进作用。

表 2 四物汤配方颗粒体内用药对骨髓抑制小鼠造血祖细胞集落数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Tab 2 Effect of siwu drugs of formula granulaon on the numbers of CFU-GM, CFU-Meg, BFU-E and CFU-E in myelosuppressed mice in vivo($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	CFU-GM	BFU-E	CFU-E	CFU-Meg
正常组 Normal control	86.2±2.6	58.2±6.1	81.2±6.3	61.3±6.3
模型组 Model group	21.7±5.3▲	15.6±1.5▲	25.9±6.6▲	15.4±4.7▲
四物汤配方颗粒组 siwu drugs of formula granulaon group	70.5±6.3△	51.2±3.5△*	73.4±11.6△*	53.8±7.3△*
阳性对照组 Positive control	82.3±9.5△	54.7±3.7△	84.2±10.3△	64.4±7.3△

▲ $P < 0.05$, vs normal control; △ $P < 0.05$, vs model group; * $P < 0.05$ vs siwu drugs group

3. 讨论

既往研究表明, G-CSF 是一种来自单核细胞和成纤维细胞, 能特异地刺激粒系祖细胞, 促进其向中性粒细胞增殖、分化, 并维持其功能和存活的造血生长因子。由于 rhG-CSF 具有与天然 G-CSF 相同的生物活性和氨基酸序列的蛋白质, 在骨髓 HSCs 的增殖分化中有着重要的作用, 近年来, rhG-CSF 已被广泛应用于造血干细胞移植、白血病及实体瘤化疗后引起的白细胞减少症, 加速骨髓受抑后的粒细胞恢复。实验结果显现其显著优于四物汤配方颗粒与四物汤组。

我们对各组小鼠 8d 后的外周血和骨髓有核细胞数进行了检测, 结果发现, 造模后 WBC、RBC 和 Hb 以及骨髓有核细胞均明显降低, 证明骨髓抑制模型是成功的, 同时发现四物汤配方颗粒对外周血各项的恢复有明显的促进作用, 进一步表明四物汤配方颗粒有促进骨髓抑制贫血小鼠骨髓造血功能恢复的作用。证明四物汤配方颗粒经过提取等科学技术方法和严格的质量控制, 在补血方面效果稳定。

体内用药对造血祖细胞的影响, 即在一定浓度范围, 四物汤配方颗粒给药组均可促进巨核系、红系造血祖细胞的增殖与分化, 减轻骨髓抑制, 促进造血。但在红系、巨核系药比较, 可能与药物的质量和作用机制有关^[5-7], 其作用机制有待进一步研究。

参考文献

1. 梁乾德, 等. 四物汤基础研究进展 (J). 天津中医药, 2003, 20 (3) : 83~86.
2. 孙纪元, 等. 再生障碍性贫血动物模型实验研究 (J). 中国实验动物学杂志, 2000,10(4):210-213
3. 陈志伟, 等. 骨髓抑制贫血小鼠模型的研究. 中国比较医学杂志, 2006; 16 (5) 260-262
4. 陈奇. 中药药理研究方法学 (M). 北京: 人民卫生出版社, 1996:1103.
5. 龚海洋, 等. 枸杞多糖对放疗及化疗引起的小鼠骨髓抑制的影响 (J). 中国中医药信息杂志, 2005,12(7):26-28
6. 吕 艳, 等. 黄芪注射液对骨髓抑制小鼠造血调控的实验研究 (J). 中药材. 2005; 28 (9) :791-793
7. 吕 艳, 等. 人参总皂甙和西洋参茎叶总皂甙对贫血小鼠造血影响的比较 (J). 成都中医药大学学报, 2005;2(2): 33

Study the effect of siwu drugs formula granula on haematogenesis function in myelosuppressed Mice

Chen Zhiwei¹, Zhu Bide¹, Xu Huiyu², Liu Zengmin¹, Chen Xinghua¹, Qin Jian¹
Department of Histology and Embryology, Cheng Du University of TCM, chengdu,
china (610075)

Department of Histology and Embryology, Bei Jing University of TCM, Bei Jing, china (100029)

Abstract

Objective: to investigate the effect of siwu drugs formula granula on haematogenesis function in myelosuppressed Mice. **Methods:** Built the mold of myelosuppressed mice by irradiated C₀⁶⁰ and injected cyclophosphamide, The drugs on the number of karyote, the proliferation of Bone Marrow hemopoietic progenitor cell were investigated by the technique method of experimentation hematology, the cultivation of hemopoietic progenitor cell. **Result:** It was found that siwu drugs formula granula could obviously increase the ,the number of karyote in peripheral blood and Bone Marrow, the proliferation of Bone Marrow hemopoietic progenitor cell. **Conclusion:** Siwu drugs formula granula can improve the blood creation ability of the bone marrow.

Keywords: siwu drug formula granula myelosuppressed

作者简介: 陈志伟, 男, 1972、7, 在读博士研究生, 副教授。