

生血丸对低剂量敌百虫暴露小鼠肝、脾、骨髓细胞及外周血淋巴细胞的影响

张晓乐¹ 王光普² 齐立聪³ 严苏纯^{2*} 荣子丹⁴ 商丹丹⁴

(1. 天津医科大学研究生院,天津市和平区气象台路 22 号,300070;2. 天津医科大学总医院;

3. 天津市蓟县中医医院;4. 天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂)

* 通讯作者: d2004012@163.com, 13207607682

[摘要] 目的 探讨生血丸对长期接触低剂量敌百虫水溶液小鼠细胞损伤的影响。方法 将 150 只 BalB/C 小鼠随机分空白组(生理盐水灌胃 40 天)、模型 1 组(敌百虫灌胃 20 天+生理盐水灌胃 20 天)、治疗组(敌百虫灌胃 20 天+生血丸灌胃 20 天)、模型 2 组(生理盐水灌胃 20 天+敌百虫灌胃 20 天)、预防组(生血丸灌胃 20 天+敌百虫灌胃 20 天)。敌百虫溶液剂量为 2 mg/kg,生血丸剂量为 2.5 g/kg,每日 1 次。检测各组小鼠肝、脾细胞中羟自由基、超氧阴离子活性、鸟氨酸脱羧酶(ODC)表达的 OD 值,计算外周血淋巴细胞、骨髓细胞微核率。结果 模型 1 组、模型 2 组小鼠肝细胞内羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达、外周血淋巴细胞微核率与空白组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),治疗组与模型 1 组、预防组与模型 2 组比较,肝细胞内羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达、外周血淋巴细胞微核率差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠脾细胞内羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达、骨髓细胞微核率未见明显差异($P > 0.05$)。结论 生血丸能有效预防和改善低剂量敌百虫暴露小鼠肝细胞氧化损伤,降低外周血淋巴细胞的微核率。

[关键词] 生血丸;敌百虫;细胞损伤;微核率

Effects of Blood Increasing Pill on the Liver, Spleen, Bone Marrow Cells and Peripheral Blood Lymphocytes in Mice Exposed to Trichlorfon

ZHANG Xiaole¹, WANG Guangpu², QI Licong³, YAN Suchun², RONG Zidan⁴, SHANG Dandan⁴

(1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070; 2. General Hospital of Tianjin Medical University; 3. TCM Hospital of Ji County, Tianjin; 4. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Corporation Limited, Darrentang Pharmaceutical Factory)

ABSTRACT **Objective** To study the effects of Blood Increasing Pill (BIP) on the liver, spleen, bone marrow cells (BMC) and peripheral blood lymphocytes (PBL) in mice chronically exposed to low-dose trichlorfon aqueous solution. **Methods** Totally 150 mice were randomized into the blank group (40 days of gavage with saline), No. 1 model group (20 days of gavage with trichlorfon+20 days of gavage with saline), treatment group (20 days of gavage with trichlorfon+20 days of gavage with BIP), No. 2 model group (20 days of gavage with saline+20 days of gavage with trichlorfon) and prevention group (20 days of gavage with BIP+20 days of gavage with trichlorfon). The dose of trichlorfon and BIP was 2 mg/kg and 2.5 g/kg respectively administered once daily. The optical density (OD) values of hydroxyl radical, superoxide anion activity and ornithine decarboxylase (ODC) in the liver cells and spleen cells were detected and the micronucleus rates in PBL and BMC were calculated. **Results** Comparing with the blank group, the OD values of hydroxyl radical and superoxide anion activity in the liver cells and the micronucleus rates in PBL in two model groups were significantly increased ($P < 0.05$), but the OD values of ODC were significantly decreased ($P < 0.05$). Both the differences between the treatment group and No. 1 model group and between the prevention group and No. 2 model group were statistically significant in the OD values of hydroxyl radical, superoxide anion activity and ODC in the liver cells and the micronucleus rate in PBL ($P < 0.05$). There was no significant difference between groups in the OD values of hydroxyl radical, superoxide anion activity and ODC in the spleen cells and the micronucleus rate in BMC ($P > 0.05$). **Conclusion** BIP can effectively prevent and relieve the hepatocytes oxidative damage and reduce the micronucleus rate in PBL in mice exposed to low-dose trichlorfon.

Keywords Blood Increasing Pill; trichlorfon; oxidative damage; micronucleus rate

敌百虫作为有机磷农药的代表之一早已广泛的应用于农牧业、水产养殖业等农业生产过程中。长期低剂量接触敌百虫虽然没有明显的临床表现,但可出现全血胆碱酯酶活性降低,并导致肝谷氨酰基转移酶(γ -GT)明显增高^[1],其可造成人体氧化应激

水平上升甚至细胞染色体损伤,而氧化应激水平与人类多种疾病的发生与发展有着密切的关系^[2-4]。近年有研究表明补肾健脾方药拥有很好的抗氧化、清除自由基、防止细胞损伤的功效^[5]。本实验通过观察生血丸对小鼠肝、脾细胞中羟自由基、超氧阴离

子自由基、鸟氨酸脱羧酶(ODC)以及骨髓嗜多染红细胞与外周血淋巴细胞微核率的影响,旨在阐述生血丸对有机磷农药慢性污染后细胞损伤的预防与修复机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物

BalB/C 小鼠 150 只,雄性,体重(20 ± 2)g,8~12 周龄,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK-(军)2007-004。

1.2 主要材料和试剂

快速姬姆萨染液:南京建成科技有限公司,批号:20101109;类标准胎牛血清:100 ml,中美合资兰州民海生工程有限公司,批号:20100921;肝素钠注射液:2 ml,1.25 万单位,常州生化千红制药厂,批号:20100502;敌百虫:250 mg, Sigma 公司,批号:8021X;羟自由基检测试剂盒:南京建成科技有限公司,批号:20110224;超氧阴离子检测试剂盒:南京建成科技有限公司,批号:20110303;ODC ELISA 试剂盒:华北制药金坦生物技术股份有限公司,批号:E03O0007;生血丸干粉:天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂,批号:k006。

1.3 主要仪器和设备

OLYMPUS 显微镜:日本, BX51;酶标仪:上海科华实验系统有限公司,型号 ST-360;高速低温离心机:美国 Sigma 公司, 3k-30;电子分析天平: Sartorius 德国, BP61 型。

1.4 动物模型制备、分组和给药

150 只小鼠采用随机数字表法分为空白组、模型 1 组、治疗组、模型 2 组、预防组,每组各 30 只。适应性饲喂 1 周开始灌胃。空白组给予生理盐水灌胃 40 天,模型 1 组给予低剂量敌百虫灌胃 20 天后再予生理盐水灌胃 20 天,治疗组给予低剂量敌百虫灌胃 20 天后再予生血丸灌胃 20 天,模型 2 组给予生理盐水灌胃 20 天后再予低剂量敌百虫灌胃 20 天,预防组给予生血丸灌胃 20 天后再予低剂量敌百虫灌胃 20 天。低剂量敌百虫溶液参照文献[2]选择剂量为 2 mg/kg,生血丸剂量为 2.5 g/kg,其均按 30 ml/kg 灌胃给药,生理盐水按等容积灌胃,每日 1 次。

1.5 外周血淋巴细胞涂片的制作及微核率的计算

经小鼠眼球后静脉丛采血取血涂片,快速姬姆萨染液染色,油镜下观察,每个样本镜下随机选择胞浆完整的淋巴细胞 1000 个。出现小于主核 1/3、染色与主核基本一致,有完全与主核分开的小核的细胞为一个微核细胞,以千分率(‰)表示。

1.6 骨髓细胞涂片的制作及微核率的计算

小鼠颈椎脱臼法处死后,取双侧股骨,用胎牛血清冲出骨髓,离心后弃上清后用 0.5 ml 胎牛血清吹打将沉淀悬浮起来后涂片,快速姬姆萨染液染色,100 倍油镜下观察,每个样本镜下随机选择胞浆完整的嗜多染红细胞 1000 个。出现小于主核 1/3、染色与主核基本一致,有完全与主核分开的小核的细胞为一个微核细胞,以千分率(‰)表示。

1.7 肝、脾细胞羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达的检测

小鼠颈椎脱臼法处死以后,取小鼠 3 份肝脏、脾脏组织各 0.05 g,加生理盐水 0.95 ml 制成 5% 组织匀浆。1 份用于羟自由基检测,按照试剂盒说明书操作,各样本以吸光值(OD)表示。1 份用于测定超氧阴离子活性,采用比色法,操作步骤按试剂盒说明书进行,各样本以吸光值表示(OD)。1 份用于 ODC 表达测定,按 ELISA 试剂盒说明书操作,在酶标仪以波长 450 nm 检测,各样本以吸光值(OD)表示。

1.8 统计学方法

使用 SPSS 11.5 统计软件进行统计,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据进行方差齐性检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠肝细胞羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达的比较

表 1 示,模型 1 组、模型 2 组的肝细胞羟自由基、超氧阴离子活性比空白组表达有显著增加、ODC 表达显著减少($P < 0.05$);治疗组与模型 1 组比较,肝细胞羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达差异均有统计学意义($P < 0.05$);预防组与模型 2 组比较,肝细胞羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达差异亦均有统计学意义($P < 0.05$);治疗组与预防组肝细胞羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠肝细胞羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达的比较(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	羟自由基	超氧阴离子活性	ODC 表达
空白组	30	0.091±0.028	0.102±0.014	0.325±0.027
模型 1 组	30	0.112±0.016*	0.161±0.017*	0.239±0.208*
治疗组	30	0.074±0.02△	0.107±0.019△	0.362±0.018△
模型 2 组	30	0.116±0.013*	0.158±0.015*	0.287±0.048*
预防组	30	0.086±0.023▲	0.113±0.020▲	0.388±0.104▲

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型 1 组比较,△ $P < 0.05$;与模型 2 组比较,▲ $P < 0.05$

2.2 各组小鼠脾细胞羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达的比较

表 2 示, 各组小鼠脾细胞羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 各组小鼠脾细胞羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达的比较(OD 值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	羟自由基	超氧阴离子活性	ODC 表达
空白组	30	0.082±0.018	0.133±0.027	0.136±0.021
模型 1 组	30	0.072±0.010	0.116±0.015	0.155±0.010
治疗组	30	0.075±0.010	0.137±0.017	0.136±0.032
模型 2 组	30	0.076±0.010	0.120±0.025	0.13±0.022
预防组	30	0.071±0.011	0.131±0.024	0.133±0.008

2.3 各组小鼠外周血淋巴细胞微核率、骨髓细胞微核率的比较

表 3 示, 模型 1 组、模型 2 组的小鼠外周血淋巴细胞微核率均比空白组显著增加($P<0.05$); 治疗组与模型 1 组比较, 外周血淋巴细胞微核率明显降低($P<0.05$); 预防组与模型 2 组比较, 外周血淋巴细胞微核率亦明显降低($P<0.05$)。各组小鼠骨髓细胞微核率差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 各组小鼠外周血淋巴细胞微核率、骨髓细胞微核率的比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	外周血淋巴细胞微核率	骨髓细胞微核率
空白组	30	2.01±0.270	1.76±0.901
模型 1 组	30	5.39±1.081*	3.12±1.984
治疗组	30	3.21±1.855△	3.02±2.106
模型 2 组	30	6.12±2.320*	2.81±0.912
预防组	30	3.98±1.042▲	2.78±0.832

注: 与空白组比较, * $P<0.05$; 与模型 1 组比较, △ $P<0.05$; 与模型 2 组比较, ▲ $P<0.05$

3 讨论

人体衰老与多种疾病都与过氧化反应造成的细胞损伤等途径有关。而其在中医里的病机之一就是脾肾不足, 既往实验中多次证实补肾类中药单味药及组方拥有很好的清除自由基, 维持体内自由基平衡及抗氧化的功效^[6]。生血丸方源于名老中医谢海洲教授临床验方, 由鹿茸、黄柏、山药、炒白术、桑枝、白扁豆、稻芽、紫河车组成, 具有补肾健脾、填精补髓之功效。君药鹿茸温肾壮阳、强筋健骨、生精益血, 是补元阳之要药, 用于治疗精血两亏, 活血又补血, 具有促进造血之功能; 紫河车益气、养血、补精, 有强壮作用; 炒白术、白扁豆、稻芽、山药为开胃健脾之品, 又有益气生血的作用, 可于大补之中防止滋

腻; 黄柏为泻火滋阴之品, 其可缓解滋补过峻而有利于其体内吸收, 全方可先天之本与后天之本同补。

本研究结果显示, 模型 1 组经 20 天低剂量敌百虫灌胃后肝脏内羟自由基、超氧阴离子活性上升($P<0.05$), 而治疗组经 20 天生血丸治疗后肝脏内羟自由基、超氧阴离子活性明显好转($P<0.05$), 说明生血丸对敌百虫致肝细胞的氧化损伤有明显的治疗作用。预防组先期用药 20 天后, 再用低剂量敌百虫灌胃 20 天, 来观察生血丸对肝细胞氧化损伤的预防作用, 结果显示预防组与模型 2 组肝脏内羟自由基、超氧阴离子活性差异有统计学意义($P<0.05$), 说明生血丸可有效预防小鼠体内自由基的产生, 拥有很好的抗氧化作用。ODC 为多胺合成过程中第一个限速酶, 而多胺在细胞有丝分裂过程中起着重要的作用, 特别是像肿瘤细胞这样细胞生长较快的时期, 多胺水平与 ODC 的活性较高, 故其虽不能特异性诊断癌症的发生, 但可以间接反应细胞的生长处于非正常时期, 具有恶变的可能性^[7]。本实验中模型 1 组、模型 2 组小鼠的肝脏细胞内的 ODC 水平与空白组差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗组与模型 1 组比较、预防组与模型 2 组比较, 小鼠肝脏中的 ODC 表达差异有统计学意义($P<0.05$), 这说明生血丸能有效的降低细胞内 ODC 活性, 从而可抑制细胞有丝分裂与生长的速度, 使之趋于正常水平。微核为细胞损伤后染色体畸变断裂后形成, 而染色体等遗传物质的变异具有致癌、致畸的可能。微核率可反映细胞损伤及染色体畸变程度^[8-9]。本实验结果显示, 低剂量敌百虫灌胃后在小鼠体内积聚可造成外周血淋巴细胞染色体损伤断裂, 微核率提高, 而生血丸可有效预防和修复外周血淋巴细胞损伤, 减少染色体断裂率, 从而进一步预防细胞突变、癌变。

另外, 各组小鼠的脾脏细胞中羟自由基、超氧阴离子活性、ODC 表达水平各组间均未见明显差异($P>0.05$); 小鼠骨髓细胞微核率各组亦无统计学意义($P>0.05$)。其可能与小鼠有机磷农药暴露时间不足有关, 也可能与脾脏、骨髓细胞不是有机磷农药代谢分布的主要器官, 其机理还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 陈顺珠, 李宗明. 内科学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 855.
- [2] 周淑芳, 沈莉, 高宇, 等. 母鼠低剂量敌百虫染毒对着床前期胚胎细胞发育及微核的影响[J]. 环境与职业医学, 2008, 25(2): 144-147.

(下转第 700 页)

上是相互协调的,肺宣发正常,津液得以布散,大肠得以濡润,同时肺主肃降是大肠传导的动力,通过大肠传导输化将浊气肃除于外。在病理方面,若肺有病变其宣发肃降功能失常,气机不利,津液不能下行,则大肠失其津液滋润,传导失职,可出现大便干结等症;反之,大肠传导功能失常,传导不利,则会影响肺的生理功能而使肺气不降,反而上逆,表现为胸闷、咳喘、呼吸困难等。在治疗中均应综合考虑,而不单纯治脏或腑。上述三味药大黄、瓜蒌、苦杏仁的使用正反映了这一点。

我们在前期研究中,认为肺与大肠之间存在经络属关系、气机升降关系、水液代谢关系、水谷传导关系、阴阳润燥关系、表里通应关系等^[15],本次研究以文献为基础,运用数据挖掘方法,对在肺与大肠相表里理论指导下治疗肺系疾病的症状与药物之间的关系进行了分析,认为气机升降关系是肺与大肠诸种关系的核心机制。而所用的药物也是使肺与大肠在气机升降上相互协调,可以说,气机升降关系作为“肺与大肠相表里”的核心机制,无论是生理功能上的密切配合,病理情况下的相互影响,还是临床治疗上的理法方药,气机升降始终贯穿着该理论的全过程。今后“肺与大肠相表里”的理论和应用研究,要以中医基础理论为指导,进一步阐明肺和大肠的功能。

参考文献

- [1] Rakesh Agrawal, Tomasz Imielinski, Arun Swami. Mining association rules between sets of items in large databases [C]//Proceedings of the 1993 ACM SIG MOD International Conference on Management of Data, Washington DC, 1993; 207-216.
- [2] 李振岳, 周怡. 伤寒病复方药对配伍规律的关联规则分析[J]. 医学信息, 2009, 22(5): 591-593.
- [3] 许钊, 彭代银, 余伯阳. 当归芍药散组方药味关联规律的

数据挖掘研究[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(5): 299-301.

- [4] 叶亮, 范欣生, 卞雅莉, 等. 古今治疗痛经的四物汤类方关联规则研究[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(20): 94-96.
- [5] 李艳, 李梢, 吕爱平. 风湿关节炎中西医临床诊察的数据挖掘分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(11): 988-992.
- [6] 沈亚诚, 陈燕升, 王小云. 绝经综合征中医证候规律的数据挖掘研究[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(8): 1369-1371.
- [7] 李文林, 赵国平, 陆建峰, 等. 关联规则在名医临证经验分析挖掘中的应用[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(1): 21-24.
- [8] 王柳青, 李鸿涛, 莫芳芳, 等. 肺与大肠经络表里对应关系初步探讨[J]. 中医杂志, 2012, 53(11): 906-908.
- [9] Ni JX, Gao SH. Understanding the viscera-related theory that the lung and large intestine are exterior-interiorly related[J]. J Tradit Chin Med, 2012, 32(2): 293-298.
- [10] Gao L, Wang J, Gao SH. Analysis on clinically drug-used law for lung-intestine related diseases d[J]. J Tradit Chin Med, 2012, 32(4): 523-528.
- [11] 中医药学名词审定委员会. 中医药学术语名词[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [12] 姚乃礼. 中医症状鉴别诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011.
- [14] Tang ZH, MaccLennan J 著. 邱祝芳, 焦贤龙, 高升译. 数据挖掘原理与应用: SQL Server 2005 数据库[M]. 北京: 清华大学出版社, 2007: 194.
- [15] 郝峦, 王键, 邓勇. 肺与大肠的脏腑关系探讨[J]. 安徽中医学院学报, 2010, 29(3): 1-3.

(收稿日期: 2012-09-07; 修回日期: 2012-12-20)

[编辑: 崔京艳]

(上接第 693 页)

- [3] 芮风, 邵剑明, 张雪英. 急性敌百虫中毒时氧化应激反应和自由基损伤机制探讨[J]. 浙江医学, 2005, 27(2): 124-125.
- [4] 张天锡. 氧化应激与脑损害、衰老的关系及其对策[J]. 实用糖尿病杂志, 2007, 3(3): 11-12.
- [5] 李颖, 白波, 黄宏兴, 等. 补肾健脾方对骨质疏松骨骼肌线粒体氧化应激的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(8): 1746-1749.
- [6] 周晓峰. 补肾中药对自由基的消除作用[J]. 浙江中医学

院学报, 2003, 27(3): 87.

- [7] 张璐. 鸟氨酸脱羧酶及其在肿瘤治疗中的应用[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1997, 18(3): 97-99.
- [8] 杨茜, 杜金茹, 栗淑媛, 等. 锰中毒患者外周血淋巴细胞微核率的观察[J]. 化工劳动保护工业卫生与职业病分册, 1995, 16(3): 110-111.
- [9] 钟小虎. 有机磷农药乐果对体外人外周血淋巴细胞微核率的影响[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(6): 730-731.

(收稿日期: 2012-10-28; 修回日期: 2012-12-10)

[编辑: 邓媛]

Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net