

益髓生血颗粒对辐射损伤小鼠造血祖细胞增殖功能的影响

邹阳¹ 孙玉雯¹ 方素萍¹ 李俊丽¹ 程艳玲¹ 刘莉¹ 吴志奎^{1*} 谭洪玲² 高月²

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区广安门内大街北线阁 5 号, 100053;

2. 中国人民解放军军事医学科学院)

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2010CB530406);

国家科技重大专项资助项目(2009ZX09301-005-2-7); 国家自然科学基金资助项目(83173167)

* 通讯作者: gamwuzhikui@sina.com, (010)88001149

[摘要] 目的 研究益髓生血颗粒治疗地中海贫血的可能作用机制。方法 72 只小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、阳性对照组和益髓生血颗粒高、中、低剂量组, 每组 12 只。除正常对照组外, 其余各组采用⁶⁰Co- γ 射线 3.5 Gy 全身一次性照射, 造成小鼠骨髓造血抑制模型。益髓生血颗粒高、中、低剂量组分别给予益髓生血颗粒 10.0 g/kg, 5.0 g/kg, 2.5 g/kg, 灌胃给药后 2 d 进行造模, 之后再连续给药 7 d; 阳性对照组造模后皮下注射重组人粒细胞刺激因子注射液 30 μ g/kg, 每天 1 次, 连续 7 d; 正常对照组、模型对照组给予等量蒸馏水灌胃。在造模后 3、7 d 进行骨髓造血祖细胞集落培养, 计数红系集落生成单位(CFU-E)、红系爆式集落生成单位(BFU-E)、混合集落生成单位(CFU-Mix)、粒单系集落生成单位(CFU-GM)、巨核系集落生成单位(CFU-Meg), 造模后 7 d 进行 CD34⁺ 细胞检测。结果 与正常对照组比较, 模型对照组于造模后 3、7 d 各集落生产单位明显降低($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 阳性对照组和益髓生血各剂量组在 3、7 d 均促进 CFU-GM、CFU-E 增殖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 益髓生血颗粒高、中剂量组在 3 d 时提高 CFU-Meg 方面优于阳性对照组和益髓生血颗粒低剂量组($P < 0.05$); 益髓生血颗粒高、中剂量组 7 d 时在提高 CFU-E 方面优于阳性对照组和益髓生血颗粒低剂量组($P < 0.05$)。模型对照组 CD34⁺ 细胞数较正常对照组明显下降($P < 0.01$), 阳性对照组和益髓生血颗粒低剂量组 CD34⁺ 细胞数较模型对照组显著上升($P < 0.05$)。结论 益髓生血颗粒能促进小鼠骨髓造血祖细胞增殖, 促进骨髓有效造血, 并且以高、中剂量作用显著。

[关键词] 益髓生血颗粒; 地中海贫血; 辐射损伤; 补肾益髓; 造血祖细胞

Effect of Yisui Shengxue Granules on the Proliferation of Hematopoietic Progenitor Cells in Irradiated Mice

ZOU Yang¹, SUN Yuwen¹, FANG Suping¹, LI Junli¹, CHENG Yanling¹, LIU Li¹, WU Zhikui¹, TAN Hongling², GAO Yue²

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053; 2. Academy of Military Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To research the possible mechanism of Yisui Shengxue Granules (granules to boost marrow and engender blood, YSG) for thalassemia. **Methods** Seventy two mice were randomized into the normal control group, model control group, positive control group and YSG high-dose, middle-dose and low-dose groups, with 12 in each. The bone marrow suppression mice models were established with ⁶⁰Co γ -ray 3.5 Gy disposable body irradiation. YSG high-dose, middle-dose and low-dose groups were gavaged with YSG containing 10.0 g/kg • 5.0 g/kg • and 2.5 g/kg crude drug. The models were established after 2-day intragastric administration and then administered for 7 consecutive days. The positive control group was injected with 30 μ g/kg • recombinant human granulocyte colony-stimulating factor once daily for 7 days. The normal control group and model control group were gavaged with equal amount of distilled water. The bone marrow hematopoietic progenitor cell colony was cultured on the 3rd and 7th day after modeling. The colony-forming unit-erythroid (CFU-E), burst-forming unit-erythroid (BFU-E), mixed colony-forming unit (CFU-Mix), colony-forming unit-granulocyte/macrophage (CFU-GM) and colony-forming unit-megakaryocytes (CFU-Meg) was counted. The CD34⁺ cell was detected on the 7th day after radiation. **Results** Comparing with the normal control group, the colony-forming units were significantly decreased in the model control group on the 3rd and 7th day after modeling. Comparing with the model control group, the CFU-GM and CFU-E proliferated significantly in the positive control group and YSG groups on the 3rd and 7th day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the positive control group and YSG low-dose group, the CFU-Meg proliferated significantly in YSG high-dose and middle-dose groups on the 3rd day ($P < 0.05$). Comparing with the positive control group and YSG low-dose group, the CFU-E proliferated significantly in YSG high-dose and middle-dose groups on the 7th day ($P < 0.05$). The CD34⁺ cell count in the model control group was significantly lower than that in the normal control group ($P < 0.01$). Comparing with the model

control group, the CD34⁺ cell counts in the positive control group and YSG low-dose group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** YSG can improve the proliferation of bone marrow hematopoietic progenitor cells, promote bone marrow effective hematopoietic, especially in high and middle dose groups.

Keywords Yisui Shengxue Granules; thalassemia; radiation damage; supplement the kidney and boost marrow; hematopoietic progenitor cells

地中海贫血(thalassemia,简称地贫)是由于基因缺失或突变,使血红蛋白珠蛋白链合成障碍,引起的一种遗传性溶血性贫血,属难治性单基因遗传病,致死、致残率极高。我国南方是地贫的高发区,在我国危害较大的有两种类型(即 α 型、 β 型)。1989年至2005年课题组在广西壮族自治区南宁、百色、河池等地区,用补肾益髓法的代表方益髓生血颗粒治疗 β -地贫患者156例取得了肯定疗效^[1]。近年,我们在广西壮族自治区高发区对地贫患者中医证候调查基础上,选取同一中医证候(肝肾阴虚,精血不足证),不同基因型的两种地贫患者,用益髓生血颗粒进行治疗也取得了肯定的疗效^[2-5]。经益髓生血颗粒治疗3个月后患者溶血性贫血明显减轻,临床症状的明显改善与血液指标的提高相一致^[6]。本实验观察了益髓生血颗粒对小鼠骨髓造血祖细胞增殖功能影响,旨在探讨补肾益髓颗粒治疗地贫的作用机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠72只,雌性,二级,6~8周龄,体重18~22g,购自中国人民解放军军事医学科学院动物中心,实验动物合格证号:SCXK-(军)007-004。

1.2 药物

益髓生血颗粒,药物组成:山萸肉12g、何首乌8g、补骨脂6g、熟地黄8g、黄芪6g、当归6g、阿胶3g、鸡血藤6g、鳖甲6g、党参8g、砂仁2g,为中国中医科学院广安门医院大兴制剂厂生产,批号:100830,深褐色颗粒粉,每10g颗粒药粉含生药量23.6g。重组人粒细胞刺激因子(G-CSF)注射液,北京双鹭药业股份有限公司生产,200 μ g/瓶,国药准字S20030049。

1.3 主要试剂与仪器

SysmexKX-21 用溶血素(STACLYSER-SYS-WH 030301)、F-820 清洗液(STACCLEANER-SYS-F 030103)、F-820 稀释液(SYS 030001)均由山东兰桥科技有限公司生产。FITC 标记的大鼠抗小鼠CD34 抗体(ab8158)及对照抗体购自美国Becton Dickinson 公司。RPMI 1640(31800-022)为 Gibco

BRL 公司产品;胎牛血清(16000-044)、马血清(16050-130)购自北京军区兽医防治中心;人红细胞生成素(EPO, GS-E10741)、白细胞介素3(IL-3, SRP4135-10UG, Sigma 公司)、白细胞介素11(IL-11, 220-11, PeproTech 公司)、L-谷氨酰胺(G-3126, Sigma 公司);羧甲基纤维素(4035-010)为 Whatman 公司产品。日本东亚 F820 型血细胞分析仪,CO₂ 培养箱为 ThermoForma 公司产品。

1.4 造模方法

参考文献[7-8],采用⁶⁰Co- γ 射线全身一次照射,照射剂量为3.5Gy,剂量率为1.31Gy/min,造成小鼠骨髓造血抑制,外周血象有形成分减少。

1.5 动物分组与给药

72只小鼠采用随机数字表法分为正常对照组、模型对照组、阳性对照组和益髓生血颗粒高、中、低剂量组,每组12只,除正常对照组外其余各组均建立小鼠骨髓造血抑制模型。益髓生血颗粒高、中、低剂量组给予益髓生血颗粒10.0g/kg,5.0g/kg,2.5g/kg,灌胃给药2d后进行造模,后再连续给药7d。阳性对照组造模后皮下注射G-CSF注射液30 μ g/kg,每天1次,连续7d。正常对照组、模型对照组给予等量蒸馏水灌胃。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 集落培养 ①造模后3d和7d分别颈椎脱臼处死小鼠,每组3只。置75%酒精中浸泡片刻消毒,取下小鼠股骨,用RPMI 1640培养液冲出骨髓细胞,过4号针头制成单细胞悬液,计数细胞并算出接种细胞悬液量,按接种有核细胞 1×10^5 /ml体系计算。②配粒系培养体系(马血清2ml;G-CSF注射液100ng;细胞 1×10^5 /孔;RPMI 1640补至7.6ml),用恒温水浴法在37℃条件下预热10min后加入5%煮沸琼脂0.5ml,用5ml注射器边加边摇快速混匀。每皿滴入上述体系1ml,放一塑料盒中并放几个加水的平皿后,于37℃、5%CO₂的条件下培养6d观察计数粒单系集落生成单位(CFU-GM)、巨核系集落生成单位(CFU-Meg),多于50个细胞为一个细胞集落。③配红系、混合系培养体系(巯基乙醇0.2ml;3%L-谷氨酰胺0.03ml;马血清

0.7 ml;EPO 100U;IL-3 60 ng;IL-11 50 ng;2.7%羧甲基纤维素 0.7 ml;细胞 1×10^5 /孔),放于振荡器上振荡片刻,加入 24 孔板中,每孔 0.2 ml,于 37℃、5%CO₂ 的条件下培养 3 d 观察计数红系集落生成单位(CFU-E),培养 7 d 观察计数红系爆式集落生成单位(BFU-E)、混合集落生成单位(CFU-Mix),多于 50 个细胞为一个细胞集落。

1.6.2 CD34⁺ 细胞的检测 造模后 7 d 颈椎脱臼处死小鼠,每组 6 只,用含 0.2%牛血清白蛋白的 PBS 缓冲液冲出小鼠股骨骨髓细胞,取 1×10^6 个细胞加入 30 μ l 小鼠血清,反应 10 min,以封闭非特异结合位点,加入 10 μ l FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD34 抗体,对照管加入相应的对照抗体,4℃避光反应 30 min。加入 2 ml 红细胞裂解液,作用 5 min,用含 0.2%牛血清白蛋白和 0.1%叠氮钠的 PBS 缓冲液洗细胞 2 次,加入终浓度为 3 μ g/ml 的 PI 染液,上机检测细胞数目。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,计量数据用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠造模 3 d 后造血祖细胞集落数目的比较

表 1 示,与正常对照组比较,模型对照组造血祖细胞各集落数目比较均明显降低($P<0.05$ 或 $P<$

0.01),提示模型对照组小鼠骨髓损伤明显,骨髓造血祖细胞增殖低下。与模型对照组比较,阳性对照组可显著提高 CFU-GM、CFU-E、BFU-E ($P<0.01$),益髓生血颗粒高、中剂量组可显著提高 CFU-GM、CFU-Meg、CFU-E、CFU-Mix ($P<0.01$),益髓生血颗粒低剂量组仅能提高 CFU-GM、CFU-E($P<0.01$)。益髓生血颗粒高剂量组在提高 CFU-GM、CFU-Meg 方面优于阳性对照组和益髓生血颗粒低剂量组($P<0.05$),益髓生血颗粒中剂量组在提高 CFU-Meg 方面亦优于阳性对照组和益髓生血颗粒低剂量组($P<0.05$),提示益髓生血颗粒高、中剂量组较低剂量组提高小鼠骨髓造血祖细胞增殖作用明显。

2.2 各组小鼠造模 7 d 后造血祖细胞集落数目的比较

表 2 示,与正常对照组比较,模型对照组造血祖细胞各集落数目比较均明显降低($P<0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组可显著提高 CFU-GM、CFU-E($P<0.01$),益髓生血颗粒高剂量组可显著提高 CFU-GM、CFU-E、BFU-E ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),益髓生血颗粒中剂量组可显著提高各集落数目($P<0.05$ 或 $P<0.01$),益髓生血颗粒低剂量组仅能提高 CFU-GM($P<0.01$)。益髓生血颗粒高、中剂量组在提高 CFU-GM 方面优于阳性对照组和益髓生血颗粒低剂量组($P<0.05$),益髓生血颗粒

表 1 各组小鼠造模 3 d 后造血祖细胞集落数目的比较(个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CFU-GM	CFU-Meg	CFU-E	BFU-E	CFU-Mix
正常对照组	3	116.5±8.4	12.3±4.0	113.0±12.7	33.3±1.7	12.0±3.4
模型对照组	3	10.3±1.7**	6.8±0.5*	59.0±3.6**	7.8±1.7**	1.0±0.8**
阳性对照组	3	48.8±6.4**△	6.3±1.3*	94.0±12.8△	5.3±0.5**△	1.3±0.5**
益髓生血颗粒高剂量组	3	70.0±4.7**△▲#	10.3±1.7△▲#	123.0±14.9△	10.0±1.6**	3.3±1.5**△
益髓生血颗粒中剂量组	3	56.3±5.0**△	11.8±2.6△▲#	115.8±18.3△	8.8±1.5**	3.3±1.5**△
益髓生血颗粒低剂量组	3	21.5±3.1**△	5.3±1.5*	114.3±10.7△	6.5±1.3**	2.3±1.3**

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型对照组比较,△ $P<0.01$;与阳性对照组比较,▲ $P<0.05$;与益髓生血颗粒低剂量组比较,# $P<0.05$

表 2 各组小鼠造模 7 d 后造血祖细胞集落数目的比较(个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CFU-GM	CFU-Meg	CFU-E	BFU-E	CFU-Mix
正常对照组	3	134.0±21.4	12.0±0.8	123.5±19.7	47.8±5.4	9.3±1.3
模型对照组	3	12.3±3.3**	2.8±1.5**	37.8±5.7**	7.0±2.9**	1.8±1.0**
阳性对照组	3	55.0±4.2**△△	3.3±1.0**	116.0±14.9△△	13.5±3.1**	1.8±0.5**
益髓生血颗粒高剂量组	3	64.3±6.2**△△▲#	3.3±1.5**	70.5±7.0**△△▲#	18.3±6.6**△#	2.0±0.8**
益髓生血颗粒中剂量组	3	69.8±4.8**△△▲#	7.3±3.0**△#	82.0±12.1**△△▲#	19.0±5.0**△#	3.8±1.3**△
益髓生血颗粒低剂量组	3	20.5±2.1**△△	2.0±0.8**	35.3±9.6▲▲	8.5±1.7	1.0±0.8**

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型对照组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与阳性对照组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与益髓生血颗粒低剂量组比较,# $P<0.05$

高、中、低剂量组在提高 CFU-E 方面亦低于阳性对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),益髓生血颗粒高、中剂量组在提高 CFU-E、BFU-E 方面优于益髓生血颗粒低剂量组($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠造模 7 d 后骨髓 CD34⁺ 细胞比较

表 3 示,与正常对照组比较,各治疗组和模型对照组小鼠 CD34⁺ 细胞数明显下降($P<0.01$);阳性对照组和益髓生血颗粒低剂量组 CD34⁺ 细胞数较模型对照组显著上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),益髓生血颗粒高、中剂量组 CD34⁺ 细胞数与模型对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 各组小鼠造模 7 d 后骨髓 CD34⁺ 细胞比较(个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CD34 ⁺
正常对照组	6	3.02±0.78
模型对照组	6	0.40±0.13*
阳性对照组	6	0.72±0.23*△△
益髓生血颗粒高剂量组	6	0.56±0.33*
益髓生血颗粒中剂量组	6	0.53±0.06*
益髓生血颗粒低剂量组	6	0.64±0.19*△

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型对照组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

3 讨论

《黄帝内经》云:“精不足者,补之以味。”益髓生血颗粒组方是根据中医肾藏精生髓、髓生血和精血同源的理论,在临床实践基础上形成的治疗地贫的有效方剂,以滋肾养阴、益精生血、健脾补气、消痞退黄为治疗原则,方中山萸肉、何首乌为君,配合熟地黄、补骨脂、黄芪、鳖甲等药共奏补肾填精、益气生血之功。意在填补肾中真阴,使真阴得养,髓海充盈,血有生源^[9-10]。其临床疗效特点之一,是能明显缓解地贫患者全身症状,提高血红蛋白,服药后患者食欲增加,整体效应提高,临床症状的明显改善与血液参数的提高相一致^[11]。以往研究表明,中药治疗地贫不能改变患者的基因突变型,但可促进 γ -珠蛋白基因表达,影响珠蛋白链比,可促进有效红细胞生成^[12]。

本实验结果表明,益髓生血颗粒对辐射损伤致小鼠肾虚髓损有明显的治疗作用,益髓生血颗粒各剂量组均能不同程度促进照射小鼠骨髓造血祖细胞各细胞集落增殖,其中高、中剂量组对小鼠骨髓造血祖细胞作用显著。已有研究证明,骨髓是辐射损伤的敏感组织,CD34⁺ 细胞代表了骨髓中的造血干祖细胞,在一定程度上反映了骨髓的造血状况^[13],本实验结果显示,经灌服益髓生血颗粒后,与模型对照组比,益髓生血颗粒低剂量组能明显升高小鼠骨髓

中 CD34⁺ 细胞数($P<0.05$)。

综上所述,补肾益髓颗粒可提高小鼠骨髓造血干/祖细胞增殖功能,激活内源性干/祖细胞,促进骨髓有效造血,为阐释益髓生血颗粒临床治疗地贫提供了实验依据。

参考文献

- [1] 吴志奎,张新华,李敏,等. 益髓生血颗粒治疗 β -地中海贫血 156 例临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(4): 352-354.
- [2] Fang S, Wu Z, Zhang X, et al. Clinical observation on YiSuiShengXueGranule on treating 156 patients with beta-thalassemia major and the molecular mechanism study [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(11): 2084-2087.
- [3] 吴志奎,刘咏梅,张新华,等. 补肾益髓法治疗 β -地中海贫血的平行对照临床研究[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(2): 137-140.
- [4] 吴志奎,张新华,刘咏梅,等. 益髓生血颗粒治疗 β -地中海贫血患者自身对照的比较研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(3): 9-11.
- [5] 王文娟,刘文军,吴志奎. 中间型地中海贫血患者中医证候分布规律研究[J]. 中医杂志, 2007, 48(8): 726-729.
- [6] 方素萍,张新华,吴志奎,等. 补肾益髓法治疗中间型珠蛋白合成障碍性贫血临床研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(10): 41-44.
- [7] 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: 25-133.
- [8] 高月,马增春,谭洪玲,等. 四物汤及其提取物对辐射致血虚证小鼠造血作用的研究[J]. 天津中医药, 2003, 20(6): 47-50.
- [9] 吴志奎. 地中海贫血症的中医病机与治则治法[J]. 中医杂志, 2009, 50(1): 73-75.
- [10] 吴志奎,张新华,方素萍,等. 基于“肾藏精生髓”理论治疗地中海贫血[J]. 中医杂志, 2011, 52(1): 20-23.
- [11] 吴志奎,方素萍,张新华,等. 基于“肾”脏象理论从肾论治治疗珠蛋白合成障碍性贫血[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(1): 65-69.
- [12] 吴志奎,方素萍,刘咏梅,等. 肾生髓、髓生血理论与治疗地中海贫血的临床实践[J]. 中医杂志, 2008, 49(2): 170-172.
- [13] Pei X. Who is hematopoietic stem cell: CD34⁺ or CD34⁻? [J]. Int J Hematol, 1999, 70(4): 213-215.

(收稿日期: 2013-01-24; 修回日期: 2013-07-04)

[编辑: 邓媛]

更正

本刊 2013 年第 17 期第 1488 页左栏倒数第 14 行“政治准绳”应为“证治准绳”,特此更正,并向读者致歉。

本刊编辑部