

参红补血颗粒调控造血因子的作用研究[△]

李朝政^{1*}, 杨海森¹, 张文卓¹, 仇志凯¹, 段青², 黄晓巍^{1#} (1. 长春中医药大学研究生学院, 长春 130117; 2. 中国中医科学院, 北京 100700)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2881-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.01

摘要 目的: 研究参红补血颗粒调控造血因子的作用。方法: 采用皮下注射乙酰苯肼, 同时腹腔注射环磷酰胺以复制小鼠血虚证模型。60只ICR小鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、复方阿胶(11 ml/kg)组与参红补血颗粒高、中、低剂量(9、6、3 g/kg)组, 灌胃给药, 每天1次, 连续14 d。酶联免疫法检测小鼠血清粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、可溶性黏附分子(VCAM-1)含量。结果: 与正常对照组比较, 模型组小鼠血清G-CSF、M-CSF、VCAM-1含量减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与模型组比较, 参红补血颗粒高、中剂量组小鼠血清G-CSF含量增加, 参红补血颗粒高、低剂量组小鼠血清M-CSF含量增加, 参红补血颗粒高、中、低剂量组小鼠血清VCAM-1含量增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: 参红补血颗粒改善血虚证模型小鼠的造血功能可能与增加造血功能相关的细胞因子的含量, 及调整模型小鼠的造血微环境状态有关。

关键词 参红补血颗粒; 环磷酰胺; 乙酰苯肼; 血虚证; 粒细胞集落刺激因子; 巨噬细胞集落刺激因子; 可溶性黏附分子

Effects of Shenhong Buxue Granules on the Regulation of Hematopoietic Factor

LI Chao-zheng¹, YANG Hai-miao¹, ZHANG Wen-zhuo¹, QIU Zhi-kai¹, DUAN Qing², HUANG Xiao-wei¹ (1. Graduate College, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China; 2. China Academy of TCM, Beijing 100700, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Shenhong buxue granules on the regulation of hematopoietic factor and hematopoietic microenvironment. METHODS: Blood deficiency syndrome model was induced by hypodermic injection of acetylphenylhydrazine and intraperitoneal injection of cyclophosphamide. 60 ICR mice were randomly divided into normal control group (constant volume of distilled water), model group (constant volume of distilled water), Compound ejiao syrup group (11 ml/kg) and Shenhong buxue granules high-dose, medium-dose and low-dose groups (9, 6, 3 g/kg). They were given medicine intragastrically once a day for consecutive 14 days. The effects of Shenhong buxue granules on G-CSF and M-CSF, and the content of VCAM-1 were detected by ELISA. RESULTS: Compared with normal control group, the serum contents of G-CSF, M-CSF and VCAM-1 were decreased in model group, there was statistical significance ($P < 0.01$); compared with model group, the serum contents of G-CSF were increased in shenhong buxue granules high-dose and medium-dose groups, the serum contents of M-CSF were increased in shenhong buxue granules high-dose and low-dose groups, the serum contents of VCAM-1 were increased in shenhong buxue granules high-dose, medium-dose and low-dose groups, there was statistical significance ($P < 0.01$, $P < 0.05$). CONCLUSIONS: Shenhong buxue granules improve hematopoietic function of blood deficiency syndrome model mice, which may be associated with the increase of the content of hematopoietic function related cytokines and the regulation of hematopoietic microenvironment in model mice.

KEYWORDS Shenhong buxue granule; Cyclophosphamide; Acetylphenylhydrazine; Blood deficiency syndrome; G-CSF; M-CSF; VCAM-1

血虚证是临床上许多疾病的伴随症状之一, 重者多见于再生障碍性贫血、肿瘤化疗后; 轻者可见妇女生产、引产、流产、刮产、放环、月经过多及崩漏等。主要表现为面色无华、头晕眼花、心悸怔忡、失眠健忘、月经量少、舌淡苔白、脉沉细弱,

等等^[1]。

研究表明, 再生障碍性贫血、肿瘤化疗后贫血常伴有造血微环境的抑制或破坏, 而造血微环境的缺陷又与产生特异性造血因子的缺陷有关^[2-3]。造血因子是促进骨髓造血细胞分化增殖和定向成熟的一系列活性蛋白, 主要有两类: 一类是集落刺激因子(Colony stimulating factor, CSF), 能刺激体外培养的造血前体细胞形成定向分化的细胞克隆, 但不能直接作用于淋巴细胞^[4-5]; 另一类是白细胞介素(IL), 可直接作用于淋巴细胞, 同时可作用于造血前体细胞, 促进其分化成熟^[6]。

[△] 基金项目: 吉林省自然科学基金资助项目(No.201115170)

* 硕士研究生。研究方向: 心脑血管疾病中西医结合基础。

E-mail: 285844577@qq.com

通信作者: 主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 心脑血管疾病中西医结合基础。E-mail: 15948000740@163.com

中药在调节和促进造血功能方面表现出较好趋势。参红补血颗粒是由红参、红景天、黄精、丹参、麦冬5味中药组成的复方制剂,具有益气滋阴、补血活血的功效^[7],研究发现其对血虚证模型动物的外周血象有明显的改善作用(另文发表)。本研究主要观察参红补血颗粒对环磷酰胺/乙酰苯肼复合因素复制血虚证模型小鼠血清粒细胞CSF(G-CSF)、巨噬细胞CSF(M-CSF)、血清可溶性黏附分子(VCAM-1)的影响,探讨参红补血颗粒通过调节相关造血因子,改善造血微环境的作用及机制。

1 材料

1.1 仪器

680型酶标仪(美国Bio-Rad公司);MEK-6318K型血液分析仪(日本光电公司);Biofuge stratos型台式高速冷冻离心机(德国Heracus公司);ULT1386-3-V41型恒温箱(美国Bio-Tek公司)。

1.2 药品与试剂

参红补血颗粒[长春中医药大学附属医院中药药实验中心,含量:1.39 g(生药)/g];复方阿胶浆(山东东阿阿胶股份有限公司,批号:111154);环磷酰胺(德国Baxter Oncology GmbH公司,批号:1B640A);乙酰苯肼(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20110127);G-CSF、M-CSF试剂盒均购自美国RD公司。

1.3 动物

ICR小鼠60只,10~12周龄,♀♂兼半,体质量20~22 g,购自吉林大学实验动物部[实验动物使用合格证号:SCXK(吉)2007-0003]。

2 方法

2.1 模型的复制

ih乙酰苯肼(20 mg/kg)1次,隔1 d再次ih乙酰苯肼(40 mg/kg)1次,并从当天起ip环磷酰胺(40 mg/kg),每天1次,连续4 d,以复制小鼠血虚证模型。正常对照小鼠同时ip等容生理盐水。

2.2 分组与给药

60只ICR小鼠随机均分为6组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、复方阿胶(11 ml/kg)组与参红补血颗粒高、中、低剂量(9、6、3 g/kg)组。ig给药,每天1次,连续14 d。

2.3 检测指标

末次给药后30 min,眶静脉取血^[8],以离心半径为64 mm、2 500 r/min离心10 min,分离血清,-80℃贮藏,备用。采用固相夹心酶联免疫法检测小鼠血清G-CSF、M-CSF含量。取小鼠血清,按照预实验进行一定比例的稀释,加入酶标反应孔中,每样品3孔,每孔100 μl,于37℃孵育60 min。用洗涤液满孔洗涤3次,每次2 min。加入酶标抗体,于37℃孵育60 min,洗涤液满孔洗涤3次,每次3 min。加入底物液(四甲基联苯胺-过氧化氢尿素溶液),每孔100 μl,于37℃避光放置3~5 min,每孔加入终止液显色。于20 min内在酶标仪450 nm波长处测定光密度(OD)值,计算各组与正常对照组的相对含量,以相对比值表示。

2.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS13.0软件处理分析实验数

据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 参红补血颗粒对模型小鼠血清G-CSF含量的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠血清G-CSF含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明乙酰苯肼和环磷酰胺联合作用对小鼠血清G-CSF的合成和分泌有抑制作用。与模型组比较,参红补血颗粒高、中剂量组小鼠血清G-CSF含量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明参红补血颗粒可能通过增加G-CSF合成及分泌量促进造血功能。参红补血颗粒对模型小鼠血清G-CSF含量的影响见表1。

表1 参红补血颗粒对模型小鼠血清G-CSF含量的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effects of Shenhong buxue granule on the serum content of G-CSF in model mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,g/kg	G-CSF,pg/ml
正常对照组		31.76 ± 11.63
模型组		17.67 ± 5.46*
复方阿胶组	11 ml/kg	29.57 ± 6.05**
参红补血颗粒高剂量组	9	22.84 ± 4.05*
参红补血颗粒中剂量组	6	22.78 ± 2.04*
参红补血颗粒低剂量组	3	16.17 ± 7.02

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.2 参红补血颗粒对模型小鼠血清M-CSF含量的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠血清M-CSF含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明乙酰苯肼和环磷酰胺联合作用对小鼠血清M-CSF的合成和分泌有抑制作用。与模型组比较,参红补血颗粒高、低剂量组小鼠血清中M-CSF含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明参红补血颗粒可能通过增加M-CSF合成及分泌量促进造血功能。参红补血颗粒对模型小鼠血清M-CSF含量的影响见表2。

表2 参红补血颗粒对模型小鼠血清M-CSF含量的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effect of Shenhong buxue granules on the serum content of M-CSF in model mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,g/kg	M-CSF,pg/ml
正常对照组		107.43 ± 19.47
模型组		88.87 ± 16.32*
复方阿胶组	11 ml/kg	113.07 ± 29.08*
参红补血颗粒高剂量组	9	113.04 ± 15.89*
参红补血颗粒中剂量组	6	83.73 ± 13.07
参红补血颗粒低剂量组	3	108.93 ± 18.66*

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: ** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: ** $P < 0.01$

3.3 参红补血颗粒对模型小鼠血清VCAM-1含量的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠血清VCAM-1含量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明乙酰苯肼和环磷酰胺联合作用对小鼠血清VCAM-1的合成和分泌有抑制作用。与模型组比较,参红补血颗粒高、中、低剂量组小鼠血清VCAM-1含量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明参红补血颗粒可能通过增加VCAM-1合成及分泌量促进造血功能。参红补血颗

粒对模型小鼠血清 VCAM-1 含量的影响见表 3。

表 3 参红补血颗粒对模型小鼠血清 VCAM-1 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Effect of Shenhong buxue granules on the serum content of VCAM-1 in model mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量, g/kg	VCAM-1, ng/ml
正常对照组		15.96 ± 2.42
模型组		13.25 ± 2.84*
复方阿胶组	11 ml/kg	16.38 ± 2.97*
参红补血颗粒高剂量组	9	16.53 ± 3.71*
参红补血颗粒中剂量组	6	17.28 ± 3.38*
参红补血颗粒低剂量组	3	17.74 ± 3.96*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: * $P < 0.05$

4 讨论

骨髓造血微环境是造血干细胞赖以生存、进行自我更新,并能产生大量祖细胞的内环境。它包括微血管系统、基质干细胞、细胞外基质和多种细胞因子。基质干细胞也称为间充质干细胞,在一定条件下可向成骨细胞、造血基质细胞、脂肪细胞等分化。细胞外基质有纤维连接蛋白、层黏蛋白和胶原蛋白等,而细胞因子则包括多种黏附分子、趋化因子等,共同协调造血干细胞的生命活动。造血细胞在微环境各种因素的调控下增殖、分化、发育及成熟。

G-CSF 是一种糖蛋白,主要功能是刺激造血干细胞增殖分化因子,对多种成熟的细胞起促进作用^[9]。M-CSF 也称为 CSF-1,是一种具有谱系特异性的细胞因子,可促进造血干细胞增殖和分化。G-CSF 和 M-CSF 的共同特点是既能促进骨髓造血功能,又有免疫调节作用。它们主要通过作用于造血干/祖细胞,加强骨髓造血祖细胞生成,并动员造血祖细胞从造血组织进入血液循环,参与骨髓造血的调节,也可通过抗原呈递的树突状细胞,以促进免疫应答^[10-11]。此外,CSF 还作用于骨髓基质细胞或成纤维细胞,影响造血微环境。

基质细胞与造血细胞的直接连接有传递转换信息分子的作用,此种连接是通过基质细胞与造血细胞表面的黏附分子实现的。VCAM-1 是介导干细胞与骨髓微环境的黏附分子,直接参与造血系的分化,并有利于骨髓造血细胞的增殖。VCAM-1 表达于骨髓微环境网状纤维细胞和骨髓微血管内皮细胞上。VCAM-1 在调节造血中有重要作用,能稳定细胞间相互作用,促进白细胞和内皮细胞的迁移,对于造血微环境的稳定有明显作用,参与造血细胞与基质细胞形成聚集体,有利于造血细胞增殖、分化^[12]。因此,血清中 G-CSF、M-CSF、VCAM-1 表达量的变化对反映造血微环境的变化有重要意义。

环磷酸胺/乙酰苯胍复合因素复制血虚证模型小鼠是血虚证研究的常用病理模型。环磷酸胺为双功能烷化剂及细胞周期非特异性药物,可干扰 DNA 及 RNA 功能,主要用于恶性肿瘤、类风湿性关节炎、儿童肾病综合征等疾病的治疗,高剂量可造成骨髓抑制和免疫功能异常。乙酰苯胍又称 N-乙酰苯胍,可诱发红细胞溶解,引起溶血性贫血^[13]。本研究采用环磷酸胺/乙酰苯胍复合因素复制血虚证模型小鼠,观察参红补血颗粒对其相关造血调节因子变化的影响,探讨其作用的可能机制。

参红补血颗粒处方中含有多种对造血功能有调节作用

的物质,如红参中的多糖和皂苷,红景天中的皂苷,黄精中的多糖^[14]和皂苷、麦冬皂苷^[15]等,可诱导 G-CSF、IL-3 和 IL-6 在内皮细胞的表达,能上调造血微环境中的内皮细胞分泌造血生长因子来调节血细胞的生成。

本研究结果表明,环磷酸胺/乙酰苯胍复合因素可造成小鼠血清 G-CSF、M-CSF、VCAM-1 含量明显减少,提示血虚证模型小鼠外周血细胞下降(另文发表)与环磷酸胺的骨髓抑制作用可影响造血微环境。参红补血颗粒作用后模型小鼠血清中 G-CSF、M-CSF、VCAM-1 含量明显增加并与外周血象变化一致,表明参红补血颗粒可能通过造血细胞间信号转导途径,对造血微环境起到一定的调节作用。由于本药为中药复方制剂,药效学成分比较复杂,在造血细胞因子与骨髓微环境相互关联及机制方面还需要继续探索。

参考文献

- [1] 张文卓,董慧,黄晓巍.血虚证中医药研究进展[J].中国当代医药,2013,20(1):16.
- [2] 刘佳佳,张亦婷,彭航,等.造血微环境的细胞和分子机理[J].生物技术通报,2013(8):17.
- [3] 张曦,张诚,陈幸华.重视造血干细胞移植中的造血微环境问题[J].第三军医大学学报,2012,34(24):2 437.
- [4] 路贵,段虎斌,郝春艳,等.促红细胞生成素与粒细胞集落刺激因子联合应用对创伤性脑损伤大鼠神经再生的影响[J].中华脑科疾病与康复杂志,2014,4(1):31.
- [5] 崔盈,栾佐,杨印祥,等.粒细胞集落刺激因子对大鼠体内外源性神经干细胞存活分化的影响[J].中国儿童保健杂志,2014,22(2):149.
- [6] 寿砚芸.Graves 病患者血清 IL-3, IL-2, sIL-2R 的表达研究[D].杭州:浙江大学,2012.
- [7] 黄晓巍,初洪波,位鸿,等.正交试验法优选参红补血颗粒提取工艺[J].吉林中医药,2012,32(11):1 152.
- [8] 张浩,申玉清.鸡血藤醇提物对血虚模型小鼠的补血作用[J].中国药房,2014,25(3):222.
- [9] Edmund K Waller.The role of sargramostim (rhGM-CSF) as immunotherapy[J]. *Oncologist*,2007,12(Suppl 2):22.
- [10] Ma ZC, Hong Q, Wang YG, et al. Effects of ferulic acid on hematopoietic cell recovery in whole-body Gamma irradiated mice [J]. *Int J Radiat Biol*,2011,87(5):499.
- [11] 孙万平.M-CSF 对大鼠 BMSCs 体外增殖和分化的作用及 BMSCs 移植对心肌梗死的实验研究[D].苏州:苏州大学,2008.
- [12] 汪枫,朱旭阳.VCAM-1 在急性心肌缺血再灌注损伤中表达的意义[J].皖南医学院学报,2010,29(5):386.
- [13] 李淑娇,唐于平,李伟霞,等.当归-红花不同配比对血虚小鼠补血作用的比较研究[J].中国药理学通报,2014,30(6):877.
- [14] 何才通,李文.黄精多糖药理功效研究进展[J].新中医报,2014,46(3):197.
- [15] 于晓文,杜鸿志,孙立,等.麦冬皂苷药理作用研究进展[J].药学进展,2014,38(4):281.

(收稿日期:2014-06-01 修回日期:2014-06-23)