

• 论 著 •

补肾健脾方治疗环磷酰胺所致小鼠骨髓造血抑制模型的研究*

甘 超¹, 朱谨宏¹, 于海涛¹, 苏 娜¹, 李 菲², 张 磊^{1△}

(1. 兰州大学第一医院检验科, 甘肃兰州 730000; 2. 兰州大学病原生物研究所, 甘肃兰州 730000)

摘 要:目的 通过建立小鼠模型来证实补肾健脾方对环磷酰胺所致骨髓造血抑制的治疗作用。方法 将 C57BL/6 小鼠分为正常对照组、骨髓造血抑制组和补肾健脾方治疗组, 骨髓造血抑制组和补肾健脾方治疗组腹腔注射环磷酰胺 3 d, 第 4 天开始, 补肾健脾方治疗组给予中药方剂灌胃治疗, 其余两组给予饮水灌胃对照。治疗 14 d 后, 利用血细胞分析仪和流式细胞仪分别检测小鼠外周静脉血血细胞计数、骨髓造血干细胞数目和骨髓单个核细胞增殖能力。结果 与正常对照组相比, 骨髓造血抑制组白细胞计数、骨髓造血干细胞数目、骨髓单个核细胞增殖能力明显下降($P < 0.01$)。经补肾健脾方治疗后, 补肾健脾方治疗组血小板计数、骨髓造血干细胞数目、骨髓单个核细胞增殖能力明显高于骨髓造血抑制组($P < 0.05$)。结论 补肾健脾方能减轻环磷酰胺化疗的不良反应, 提高化疗药物的抗肿瘤效果。

关键词:骨髓造血抑制; 环磷酰胺; 造血干细胞; 补肾健脾方

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)22-3080-03

Study on Bushen Jianpi Recipe in treating bone marrow hematopoietic suppression mouse model caused by cyclophosphamide*

GAN Chao¹, ZHU Jinhong¹, YU Haitao¹, SU Na¹, LI Fei², ZHANG Lei^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China;

2. Institute of Pathogen Biology, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To verify the effects of Bushen Jianpi Recipe (BSJP) on bone marrow hematopoietic suppression mouse model caused by cyclophosphamide. **Methods** The experimental C57BL/6 mice were divided into the normal control group, bone marrow hematopoietic suppression group and BSJP treatment group, and the bone marrow hematopoietic suppression group and BSJP treatment group were peritoneally injected with cyclophosphamide for 3 d. The BSJP group began to be given with BSJP by gavage from 4 d, and the other two groups received water as gavage control. After 14 d treatment, peripheral venous blood cells count, bone marrow hematopoiesis stem cells (HSCs) count and bone marrow mononuclear cell proliferation ability were detected by using the blood cells analyzer and flow cytometry. **Results** Compared with the control group, the white blood cells (WBCs) count, HSCs number and bone marrow mononuclear cell proliferation ability in the hematopoietic suppression group were decreased significantly ($P < 0.01$); the platelet count, HSCs count and bone marrow mononuclear cells proliferation ability after BSJP treatment in the BSJP treatment group were significantly higher than those in the hematopoietic suppression group ($P < 0.01$). **Conclusion** BSJP can alleviate the side effect of cyclophosphamide chemotherapy and increase the anti-tumor effect of chemotherapeutic drugs.

Key words: bone marrow hematopoietic suppression; cyclophosphamide; hematopoietic stem cells; bushen jianpi recipe

临床上, 环磷酰胺被普遍应用于肿瘤、类风湿性关节炎、小儿肾病等疾病治疗, 且治疗效果较佳, 但是会出现抑制造血系统的不良反应。恶性肿瘤患者治疗成功的关键是增强患者的造血功能和抗肿瘤免疫^[1], 环磷酰胺引起的造血抑制给肿瘤的治疗带来了风险。各种造血刺激因子的应用可以解决一些造血功能抑制的问题, 但是这类药物不仅价格昂贵、作用的时间不持久, 而且具有一定不良反应。中医观点认为由化疗引起的造血抑制主要表现为脾肾两虚、气血不足^[2-3]。为弥补脾肾亏虚, 本研究采用补肾健脾方去治疗由环磷酰胺所致的骨髓造血抑制, 旨在从中医药的角度去改善患者的造血抑制状态。

1 材料与方

1.1 材料 选取兰州大学医学实验动物中心 3 周龄 C57BL/6 小鼠进行研究, 每只 20~30 g, 雌性, 无特定病原体, 并将其分成正常对照组 (Naive 组)、骨髓造血抑制组 (Model 组) 和补肾健脾方治疗组 (BSJP 组)。动物实验严格遵循兰州大学实验动物管理和使用伦理委员会的规定和章程。

1.2 仪器与试剂 anti-Mouse PE-CD34、anti-Mouse PerCP-CD117、anti-Mouse FITC-Sca-1 购自美国 BD 公司; 5(6)-羧基二乙酸荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 购自北京索莱宝科技有限公司; 3,8-二氨基-5-[3-(二乙基氨基)丙基]-6-苯基吡啶二碘 (PD) 购自东仁化学科技有限公司; RPMI-1640 培养液购自美国 HyClone 公司; 胎牛血清购自新西兰 Gibco 公司; 流式细胞仪购自美国 ACEA NovoCyte 公司; XE-5000 血液分析仪购自日本 Sysmex 公司。

1.3 方法

1.3.1 补肾健脾方的制备方法 称取淫羊藿 60 g、菟丝子 20 g、杜仲 30 g、怀牛膝 30 g、枸杞子 30 g、黄芪 30 g、白术 30 g、茯苓 30 g、猪苓 20 g, 添加 10 倍量水, 浸泡 30 min 后, 于中药煎药壶中煎煮 60 min, 用纱布过滤。继续在残渣中添加 10 倍量水, 煎煮 60 min 后过滤。合并滤液并旋转蒸发浓缩至含生药浓度 1 g/mL, 4℃ 存储备用。

1.3.2 小鼠骨髓造血抑制模型构建方法 Model 组和 BSJP

* 基金项目: 甘肃省卫生行业计划管理项目 (GWGL2014-48)。

作者简介: 甘超, 男, 主管技师, 主要从事 T 细胞耗竭机制的相关研究。△ 通信作者, E-mail: zhanglei483@126.com。

组小鼠腹膜内连续注射环磷酰胺 3 d,注射剂量为 100 mg/kg,每天 1 次。造模完成的次日,给予补肾健脾方组中药方剂灌胃治疗,方剂含生药浓度为 1 g/mL,每天 0.2 mL,每天 1 次,持续 14 d,其余两组饮水灌胃。

1.3.3 检测方法 治疗 14 d 后,取小鼠尾静脉血 20 μ L 加至专用稀释液内,用 XE-5000 血液分析仪进行细胞计数。颈椎脱臼处死小鼠后,取小鼠双侧大腿骨,无菌注射器吸取 1 mL 完全的 RPMI-1640 培养基,冲洗出骨髓细胞,调整细胞数为 1×10^7 cells/mL,加入 anti-Mouse CD34-PE、anti-Mouse c-Kit-PerCP/Cy5.5 和 anti-Mouse Sca-1-FITC 抗体,避光孵育 30 min。取 1 mL 细胞悬液,经洗涤、离心、PBS 重悬后加入 110 μ L PBS 和 1.1 μ L CFSE 原液,混匀,避光反应 5 min。经洗涤、重悬、铺板后,培养 7 d,加入 PI 染液,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,洗

涤,上流式细胞仪检测小鼠骨髓单个核细胞增殖能力。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism6 软件进行数据分析,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组血细胞计数比较 各组红细胞计数结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);Model 组白细胞计数明显低于 Naive 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);BSJP 组白细胞计数高于 Model 组,差异无统计学意义($P > 0.05$);Model 组血小板计数低于 Naive 组,差异无统计学意义($P > 0.05$);BSJP 组血小板计数明显高于 Model 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

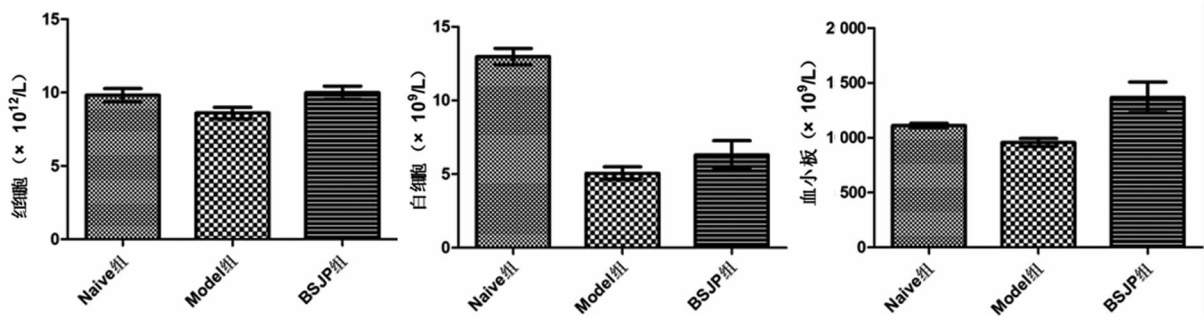
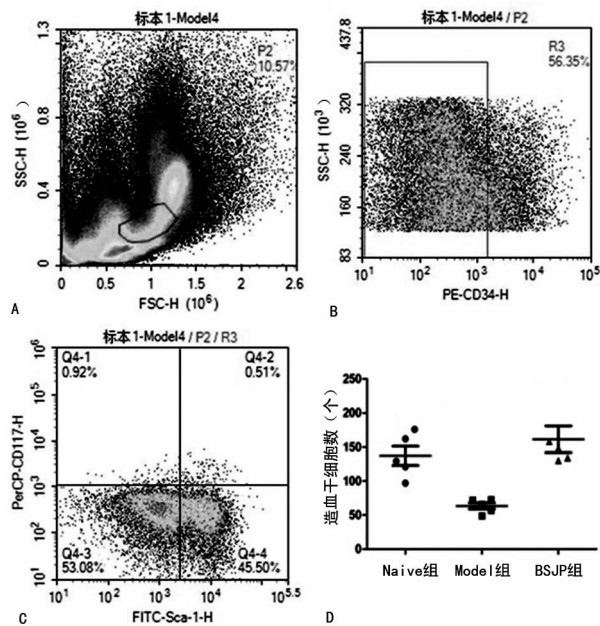


图 1 各组外周血红细胞、白细胞、血小板细胞计数结果

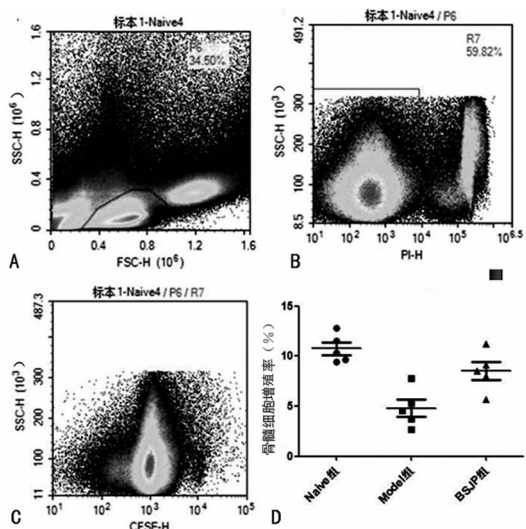
2.2 各组骨髓造血干细胞数目比较 Model 组造血干细胞数目明显低于 Naive 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);BSJP 组造血干细胞数目明显高于 Model 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。



注:A 为通过反向设门确定的造血干细胞的集中区域;B 为 CD34 阴性细胞;C 为 Sca-1 和 CD117 双阳性细胞;D 为造血干细胞数比较。

图 2 各组造血干细胞数目

2.3 各组骨髓单个核细胞增殖能力比较 Model 组骨髓单个核细胞增殖能力明显低于 Naive 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);BSJP 组骨髓单个核细胞增殖能力明显高于 Model 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。



注:A 为单个核细胞;B 为活细胞;C 为 CFSE 在发生增殖细胞中的分布情况;D 为各组骨髓细胞增殖率。

图 3 各组骨髓单个核细胞增殖能力

3 讨 论

环磷酰胺具有抑制骨髓造血的作用,其抑制骨髓造血的机制可能是通过破坏细胞分子传导化学信号,抑制骨髓造血干细胞迁徙,影响其分化和增殖能力^[4]。传统中医学认为,肾中藏精,精气生髓,髓藏纳于骨腔中,髓滋养骨,肾精气之盛衰,可以直接对骨骼的营养和生长功能造成影响,最终影响骨髓造血功能。现代中医认为由化疗引起的造血抑制主要表现为脾肾两虚、气血不足。为弥补脾肾亏虚,本研究选用了补肾健脾方来治疗环磷酰胺所致的造血抑制,其成分由淫羊藿、菟丝子、杜仲、怀牛膝、枸杞子、黄芪、白术、茯苓、猪苓构成,具有健脾补肾、调节骨髓功能的作用。方剂中淫羊藿、菟丝子、杜仲、怀牛

膝、枸杞子均为常用的补肾中药^[5]；黄芪、白术、茯苓、猪苓具有健脾作用。药理实验证明黄芪不仅对骨髓抑制模型有明显的治疗作用,而且能增强正常动物的免疫功能^[6]。

红细胞和血红蛋白的生成不足在肿瘤患者中比较常见^[7],白细胞减少的发生在肿瘤患者的治疗中也比较普遍^[8],环磷酰胺化疗可在短时间内引起患者外周血红细胞、白细胞、血小板减少^[9]。本研究中环磷酰胺造模的剂量为 100 mg/kg,属于短期内大剂量给药,可引起白细胞和造血干细胞明显下降,且作用比较持续稳定^[10]。造血干细胞又叫做多能干细胞,具有造血功能,Sca-1、CD34、c-Kit 是小鼠造血干细胞常见的几个标记物^[11]。本研究中小鼠骨髓细胞经造血干细胞标记抗体 anti-Mouse CD34-PE、anti-Mouse c-Kit-PerCP/Cy5. 5 和 anti-Mouse Sca-1-FITC 染色后检测,结果显示:小鼠骨髓细胞数目在环磷酰胺作用下出现明显下降,Model 组骨髓单个核细胞增殖能力明显低于 Naive 组,差异有统计学意义($P<0.01$);但是经补肾健脾方治疗后,小鼠骨髓细胞数目出现恢复,BSJP 组骨髓单个核细胞增殖能力明显高于 Model 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。这表明环磷酰胺能抑制骨髓造血,补肾健脾方能改善环磷酰胺所致的小鼠骨髓造血抑制状态。

本研究中,各组红细胞计数水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),与赵静梅等^[12]研究相似。这可能是由于红细胞的更新周期为 120 d,而本研究从造模开始至检测一共才 17 d,因此环磷酰胺还未曾影响到红细胞的生成。Model 组白细胞较 Naive 组出现明显下降,经补肾健脾方治疗后,BSJP 组白细胞数目有所上升,其水平高于 Model 组($P>0.05$)。这可能是 BSJP 组标本量较少引起的偶然误差,后续的深入研究将扩大标本量进一步统计其差异。

综上所述,补肾健脾方具有改善环磷酰胺所致小鼠骨髓造血抑制状态,其作用机制可能是通过增加骨髓造血干细胞数目,增强造血干细胞增殖能力,从而促进骨髓抑制小鼠造血功能的恢复。本研究为临床减轻环磷酰胺化疗不良反应提供了新的中医治疗思路。

参考文献

[1] Xu M, He RR, Zhai YJ, et al. Effects of carnosine on cyclophosphamide-induced hematopoietic suppression in mice[J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(1):131-142.
[2] 刘启华,王旭. 益气补血汤治疗化疗后白细胞减少 89 例

疗效观察[J]. *中国中医药科技*, 2007, 14(6):447-447.

[3] 苗文红. 补肾健脾法治疗肿瘤放、化疗所致骨髓抑制 98 例[J]. *陕西中医*, 2000, 21(7):289-289.
[4] 马增春,谭洪玲,肖成荣,等. 环磷酰胺损伤小鼠骨髓造血的机制[J]. *毒理学杂志*, 2007(4):332-332.
[5] 赵文静,王历,王芝兰,等. 淫羊藿的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中医药信息*, 2016, 33(2):105-108.
[6] 赵镛,高永翔. 黄芪多糖的免疫调节作用研究进展[J]. *中医临床研究*, 2012, 04(5):4-6.
[7] Grant MD, Piper M, Bohlius J, et al. Epoetin and darbepoetin for managing anemia in patients undergoing cancer treatment: comparative effectiveness update [M]. Rockville: Agency for Healthcare Research and Quality, 2013: 203-210.
[8] Liu K, Wang GB, Cheng B, et al. Clinical comparison of GC regimen (gemcitabine and cisplatin) versus FEC regimen (fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide) as neoadjuvant chemotherapy for breast cancer [J]. *Ai Zheng*, 2007, 26(4):427-430.
[9] Petrucci MT, Avvisati G, La Verde G, et al. Intermediate-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor is a valid alternative to high-dose cyclophosphamide for mobilizing peripheral blood CD34+ cells in patients with multiple myeloma[J]. *Acta Haematol*, 2003, 109(4):184-188.
[10] Feng L, Huang Q, Huang Z, et al. Optimized animal model of cyclophosphamide-induced bone marrow suppression [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2016, 119(5):428-435.
[11] Saleh M, Shamsasanjan K, Movassaghpourakbari A, et al. The impact of mesenchymal stem cells on differentiation of hematopoietic stem cells[J]. *Adv Pharm Bull*, 2015, 5(3):299-304.
[12] 赵静梅,杨旭辉,王广占,等. 补肾解毒活血法对骨髓抑制小鼠造血功能的影响[J]. *环球中医药*, 2012, 5(1):12-15.

(收稿日期:2017-03-29 修回日期:2017-07-18)

(上接第 3079 页)

[7] Unoki M, Daigo Y, Koinuma J, et al. UHRF1 is a novel diagnostic marker of lung cancer[J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(2):217-222.
[8] Daskalos A, Oleksiewicz U, Filia A, et al. UHRF1-mediated tumor suppressor gene inactivation in nonsmall cell lung cancer[J]. *Cancer*, 2011, 117(5):1027-1037.
[9] Morgensztern D, Waqar S, Subramanian J, et al. Prognostic impact of malignant pleural effusion at presentation in patients with metastatic non-small-cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(10):1485-1489.
[10] 于瑞珍,于国厚,徐传胜. 胸腔积液脱落细胞与肿瘤标志物联合检查的临床价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(16):2414-2416.

[11] Bostick M, Kim JK, Estève PO, et al. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells[J]. *Science*, 2007, 317(5845):1760-1764.
[12] Rottach A, Frauer C, Pichler G, et al. The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(6):1796-1804.
[13] Unoki M, Brunet J, Mousli M. Drug discovery targeting epigenetic codes: the great potential of UHRF1, which links DNA methylation and histone modifications, as a drug target in cancers and toxoplasmosis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78(10):1279-1288.

(收稿日期:2017-03-27 修回日期:2017-07-16)