

补肾生血解毒方对再生障碍性贫血小鼠白细胞生成的影响

董 玢¹ 张 弛² 刘 涓¹ 柴立民¹

(1.北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部和北京市重点实验室,北京 100700;

2.北京中医药大学,北京 100029)

摘 要 目的:探讨补肾生血解毒方对理化因素致骨髓抑制造成再生障碍性贫血(AA)模型小鼠白细胞生成的影响。方法: BALB/C 小鼠随机分为空白组、模型组和补肾生血解毒方小、中、大剂量组,除空白组以外其余各组小鼠以⁶⁰Co- γ 射线复合环磷酰胺致小鼠骨髓造血抑制,补肾生血解毒方小、中、大剂量组分别给予不同剂量中药灌胃,其余2组予等量生理盐水灌胃。血细胞计数仪检测小鼠外周血中白细胞(WBC)的改变,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测外周血血清中粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)含量的差异,real-time PCR检测骨髓细胞中GM-CSF受体 α 、 β 基因表达的改变。结果:与模型组比较,补肾生血解毒方可以明显提高AA模型小鼠外周血白细胞数量(小剂量作用14d),显著增加外周血血清中GM-CSF含量和骨髓细胞中GM-CSF受体基因的表达。结论:补肾生血解毒方治疗AA发挥疗效作用,可能与提高GM-CSF活性和诱导造血细胞分化为成熟的白细胞,并促进其增殖、发挥免疫调节作用有关。

关键词 再生障碍性贫血 补肾生血解毒方 白细胞 粒细胞-巨噬细胞 骨髓细胞 实验研究

中图分类号 R556.505 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)01-0077-03

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是由于化学、物理、生物因素及不明原因引起的骨髓造血功能衰竭,红骨髓总容量减少,代以脂肪髓,骨髓中无恶性肿瘤浸润,以全血细胞减少为主要表现的一组综合征,临床上常表现为较为严重的贫血、出血和感染^[1]。我们以当归补血汤和龟鹿二仙胶化裁创立补肾生血解毒方,用于临床治疗急性慢性AA,取得了良好的治疗效果。为进一步研究补肾生血解毒方治疗AA的作用机制,我们以理化因素致骨髓抑制造成AA小鼠模型,予补肾生血解毒方干预,观察该方对AA小鼠外周血白细胞(White blood cell, WBC)生成的影响,以及血清中粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)含量和GM-CSF受体(GM-CSF receptor, GM-CSF1R) α 、 β 基因表达的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物 BALB/C近交系小鼠50只,雄性,体重(20 $\pm$ 2)g,8~12周龄,动物质量合格证明编号:0269024,饲养于东直门医院屏障级实验动物中心。

1.2 药物与试剂 环磷酰胺购自山西普德药业股份有限公司;补肾生血解毒方,处方:龟板胶、鹿角胶、人参、枸杞子、黄芪、当归、黄连(1:2:3:4:6:1:1),由北京中医药大学东直门医院药剂科提供;GM-CSF酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) kit 购自武汉博士德生物有限责任公司, SYBR Green PCR Master Mix 购自美国Life Technologies公司。

2 实验方法

2.1 分组、造模及药物干预 将小鼠随机分为5组,分别为

空白组、模型组和补肾生血解毒方小、中、大剂量组,每组10只。除空白组以外,其余各组小鼠一次全身2.5Gy⁶⁰Co- γ 射线照射(剂量率1.1053Gy/min,距离240cm,时间135s),空白组小鼠假照射(铅砖屏蔽)。分别于照射后第4、5、6天腹腔注射环磷酰胺40mg/kg^[2],空白组小鼠注射等容量生理盐水。造模结束后第1天开始药物干预,补肾生血解毒方小、中、大剂量组按成人剂量的5、10、20倍计算,分别灌胃给予补肾生血解毒方6.14、12.29、24.57g/(kg·d),模型组和空白组分别给予等量的生理盐水,连续灌胃13d。

2.2 外周血WBC数量检测 分别于造模结束后0、7、14d,小鼠尾静脉取血,血细胞计数仪检测外周血中WBC数量。

2.3 外周血血清及骨髓细胞样品制备 药物干预结束后,小鼠摘眼球取血,室温放置1h后,2500r/min离心15min,分离血清,-20℃储存备ELISA检测。分离小鼠股骨,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗骨髓细胞至平皿中,离心收集细胞, PBS重悬成单细胞悬液,细胞浓度为1 $\times$ 10⁷/mL,备real-time PCR检测。

2.4 ELISA检测血清中GM-CSF的含量 取小鼠外周血血清,严格按照ELISA kit说明操作,检测小鼠外周血血清中GM-CSF的含量。

2.5 Real-time PCR检测骨髓细胞中GM-CSF1R α 、 β 基因的表达 Trizol一步法提取骨髓细胞总RNA,经反转录成cDNA,设计看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)和GM-CSF1R α 、 β 特异

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81373583)

性 PCR 引物,real-timePCR 检测小鼠骨髓细胞中 GM-CSFR α 、 β 基因表达的改变。取一样品 cDNA 作为相对标准品,倍比稀释,以 GAPDH 为扩增引物,与目的基因在同一程序中扩增,绘制标准曲线,通过荧光检测阈值读取目的基因的相对拷贝数,计算其与 GAPDH 基因拷贝数的比值,以消除实验误差。PCR 引物序列——GAPDH:sense,5'-CAGCAAG GACTGAGCAAGA;antisense,5'-GCCCCTCCTGTTATTATG GGG。GM-CSFR α :sense,5'-TGAAGCGATGCTGATAGACG; antisense,5'-TCCAGGGTGATTGACAGGAT。GM-CSFR β :sense, 5'-AAAGTGCCAAAATGGACCAG;antisense,5'-AGCTGCAGA TGATGTGGTTG。由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成。

2.6 统计学方法 实验数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,结果采用($\bar{x} \pm s$)表示,通过统计软件对数据做正态性和方差齐性检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间均数比较采用 LSD 法或 Tamhane 法。 $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有极显著性。

3 实验结果

3.1 补肾生血解毒方对 AA 小鼠外周血中白细胞数量的影响 见表 1。与空白组比较,其余各组小鼠在造模完成后外周血中 WBC(即粒细胞、单核细胞和淋巴细胞)数量均明显下降($P < 0.01$)。予中药或生理盐水灌胃 7d 后,模型组和补肾生血解毒方各剂量组小鼠 WBC 无明显上升趋势;14d 后,与模型组比较,补肾生血解毒方各剂量组外周血 WBC 均呈现升高趋势,其中补肾生血解毒方小剂量组 WBC 升高较为明显($P < 0.05$)。

表 1 补肾生血解毒方对 AA 小鼠外周血白细胞数量的影响($\bar{x} \pm s$, g/L)

组别	动物数	造模后天数		
		0d	7d	14d
空白组	10	4.74 $\pm$ 1.24	3.95 $\pm$ 1.06	5.09 $\pm$ 0.88
模型组	10	0.59 $\pm$ 0.20 $\Delta\Delta$	0.48 $\pm$ 0.23 $\Delta\Delta$	2.41 $\pm$ 0.93 $\Delta\Delta$
补肾生血解毒方小剂量组	10	0.46 $\pm$ 0.19 $\Delta\Delta$	0.50 $\pm$ 0.24 $\Delta\Delta$	3.32 $\pm$ 0.32 $\Delta\Delta^*$
补肾生血解毒方中剂量组	10	0.46 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta$	0.36 $\pm$ 0.23 $\Delta\Delta$	2.60 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta$
补肾生血解毒方大剂量组	10	0.48 $\pm$ 0.17 $\Delta\Delta$	0.68 $\pm$ 0.32 $\Delta\Delta$	2.64 $\pm$ 0.57 $\Delta\Delta$

注: $\Delta\Delta$ 与空白组比较, $P < 0.01$; * 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3.2 补肾生血解毒方对 AA 小鼠外周血血清中 GM-CSF 和骨髓细胞 GM-CSF 受体基因表达的影响 见表 2。与模型组和空白组相比,补肾生血解毒方各剂量组小鼠血清中 GM-CSF 显著升高($P < 0.01$),模型组与空白组相比 GM-CSF 含量无显著性差异;与模型组比较,补肾生血解毒方各剂量组骨髓细胞中 GM-CSFR α 基因表达明显升高($P < 0.01$);而 GM-CSFR β 基因表达仅补肾生血解毒方大剂量组与模型组和空白组相比有极显著性差异($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠血清中 GM-CSF 含量和骨髓细胞中 GM-CSFR α 、 β 基因表达的差异($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	GM-CSF 含量 (pg/mL)	GM-CSFR α /GAPDH 基因表达相对拷贝数比值	GM-CSFR β /GAPDH 基因表达相对拷贝数比值
空白组	10	79.717 $\pm$ 10.801	0.875 $\pm$ 0.512	1.096 $\pm$ 0.489
模型组	10	72.841 $\pm$ 11.199	0.318 $\pm$ 0.242	0.530 $\pm$ 0.302
中药小剂量组	10	129.120 $\pm$ 32.211 $^{**\Delta\Delta}$	0.930 $\pm$ 0.292 **	0.720 $\pm$ 0.399
中药中剂量组	10	152.559 $\pm$ 25.236 $^{**\Delta\Delta}$	0.966 $\pm$ 0.379 **	1.302 $\pm$ 0.793
中药大剂量组	10	150.476 $\pm$ 24.892 $^{**\Delta\Delta}$	1.134 $\pm$ 0.540 **	2.795 $\pm$ 1.063 $^{**\Delta\Delta}$

注:**与模型组比较, $P < 0.01$; $\Delta\Delta$ 与空白组比较, $P < 0.01$ 。

4 讨论

根据 AA 的中医证候特点,外邪和内伤等多种致病因素导致气血亏虚,伤及肝脾肾诸脏,气血不足,髓脉空虚,内生毒邪留滞弥散,耗损髓脉,精不化血,出现血虚的证候。气血精津亏损,毒邪内生,髓脉受损,血脉空虚,气血凝滞,内毒进一步损伤血脉,形成循环往复的病理损伤。AA 病位在肝脾肾,髓脉损伤之本虚为主,内毒侵蚀之标实为辅。在治疗上应以填补肾精为主,辅以益气生血解毒。龟鹿二仙胶具有填补肾精、益气壮阳的功效,用于本方取其补肾填精;当归补血汤是金元时期李东垣创制的“补气生血”经典名方,配以黄连,奏“补气生血解毒”之功。诸药协同,补肾填精、生血解毒,达到治疗 AA 的目的。

GM-CSF 是一种调节造血细胞增殖和分化的细胞因子,是分子量为 22kD 的糖蛋白。GM-CSF 与 GM-CSFR 结合后促进多种造血细胞的存活、增殖、分化,并通过提高中性粒细胞、单核细胞、树突状细胞等的数量发挥免疫调节作用^[1]。体外实验研究发现,随着 GM-CSF 浓度的增加,首先单核巨噬细胞增殖,随后是中性粒细胞,最后是嗜酸性粒细胞和巨噬细胞。此外 GM-CSF 还能刺激多能干细胞和早期红细胞的增殖和分化^[4-6]。GM-CSFR 由 α 、 β 两个受体组成,都属于 I 型细胞因子超家族成员。 α 受体可与 GM-CSF 发生特异性结合,但亲和力较低;单独 β 受体不能与 GM-CSF 结合,但与 α 受体结合可形成高亲和力的聚合体。GM-CSF 与受体结合后引起 $\alpha\beta$ 受体二聚化和四聚化,活化络氨酸激酶,受体本身磷酸化,动员 SH2 和 PTR 结构域的蛋白到受体,传递刺激信号,诱发促进造血干细胞向 WBC 转化,促进 WBC 增殖^[7]。

AA 是因多重因素所致的骨髓造血功能衰竭,是以造血干细胞数量减少或质的缺陷为主导的造血障碍,临床上以全血细胞减少为主要表现。重型 AA 成熟的治疗措施是免疫抑制治疗和造血干细胞移植。当缺乏组织相容性同源供体、患者年龄或无法负担高额的干细胞移植成本等情况出现时,免疫抑制治疗就成为首选的 AA 治疗措施^[8]。中医药治疗的多层次、多靶点的整体治疗模式,是造血干细胞移植和免疫抑制治疗的有效补充治疗模式。我们的前期实验研究证实,补肾生血解毒方通过刺激干细胞因子的表达,诱导造血干细胞的增殖^[9]。为进一步探讨补肾生血解毒方治疗 AA 的作用靶点,我们对该方促进外周血白细胞生成的机制进行了深入研究。本实验结果显示:补肾生血解毒方可以明显升高 AA 小鼠外周血中 WBC 的数量;ELISA 检测显示,该方可以明显增加 AA 小鼠外周血中 GM-CSF 的含量,对 GM-CSFR 基因的表达亦有显著的刺激作用。由此我们认为,补肾生血解毒方可以通过 GM-CSF/GM-CSFR 信号途径,调节造血细胞的增殖和分化,促进外周血中白细胞的生成,恢复体内免疫调节的稳态,来达到治疗的目的。这可能是补肾生血解毒方治疗再生障碍性贫血的关键作用机制之一。

5 参考文献

- [1] 陈灏珠.实用内科学.北京:人民卫生出版社,2001:2088
- [2] 孙纪元,王四旺,谢艳华,等.再生障碍性贫血的动物模型实验研究.中国实验动物学杂志,2000,10(4):210