

炙甘草汤、右归饮刺激脐静脉内皮细胞分泌 TPO 与 EPO 的比较研究

马 鹏 刘 渊

(成都中医药大学, 四川成都 610075)

摘 要 目的:比较研究炙甘草汤、右归饮对脐静脉内皮细胞分泌 TPO 与 EPO 的影响。方法:脐静脉内皮细胞设空白对照组、炙甘草汤组、右归饮组及混合组,每组分别加入相应的中药液,于培养第 3、6、9 天收集细胞培养上清,ELISA 方法检测细胞培养上清中 TPO 与 EPO 的分泌水平。结果:(1)TPO 分泌方面,第 6 天,与空白对照组比较,炙甘草汤明显刺激脐静脉内皮细胞产生 TPO;第 9 天,炙甘草汤单独作用以及两种中药联合使用时 TPO 的产生与空白对照组相比也有明显差异。(2)EPO 分泌方面,第 6 天与第 9 天,右归饮作用时能够刺激脐静脉内皮细胞产生 EPO,但炙甘草汤单独作用以及两种中药联合使用时却不能明显刺激细胞产生 EPO。结论:在刺激细胞产生 TPO 方面,炙甘草汤的效果最明显,而在刺激细胞产生 EPO 方面右归饮表现出更好的效果,两个方剂作用机制存在差异,且两个方剂的刺激作用均存在持续性。

关键词 炙甘草汤 右归饮 脐静脉内皮细胞 TPO EPO 体外实验

中图分类号 R285.5 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)05-0073-02

炙甘草汤作为治疗“脉结代,心动悸”的主方,已沿用近两千年,疗效显著,为广大医家所称赞。本方为滋阴补血、通阳复脉之剂,是治疗气血阴阳虚损之常用方剂,临床广泛运用于冠心病、心律失常等心血管疾病,并在血液系统、肿瘤等方面有大量研究^[1-2]。中医认为“心主血脉”,心通过“化赤”等作用参与血的生成,清代名医唐宗海把炙甘草汤作为心参与生血的代表方,临床上也不乏通过中药改善骨髓微循环加强血生成的报道^[3]。右归饮为张景岳所制,属于阴阳互济法的代表方剂,为“阴中之阳药”。右归饮在临床有广泛应用,如血证、火证、痰病等病证^[4]。两个方剂均属阴阳互济之方,但两方又有所侧重,虽均能参与生血,但其生血机制有无差异一直是研究者关心的问题。本研究以人脐静脉内皮细胞为对象,选取造血因子 TPO 与 EPO,在体外环境下比较两方对脐静脉内皮细胞产生的影响。

1 实验材料

1.1 细胞株 脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 购于中科院上海细胞库。

1.2 主要药物 炙甘草汤由炙甘草、桂枝、人参、生地黄、麦门冬、麻仁、大枣、生姜、阿胶组成,方中各成分比例为 12:9:6:50:10:10:10:10:5;右归饮由熟地、山药、山茱萸、枸杞、甘草、杜仲、肉桂、制附子组成,方中各成分比例为 20:10:10:10:5:10:4:5。所有中药均购自北京同仁堂。中药煎煮后进行过滤除渣、高温灭菌,每毫升药液含生药 0.2g。

1.3 试剂 DMEM 培养基(GIBCO),FBS(GIBCO),谷氨酰胺(GIBCO),六孔培养板(Coming),0.25% Trypsin-EDTA

(GIBCO),TPO ELISA 试剂盒(CUSABIO),EPO ELISA 试剂盒(CUSABIO)。

2 实验方法

2.1 分组 细胞分为空白对照组(只加基本培养基,不加中药液)、右归饮组、炙甘草汤组及混合组(添加炙甘草汤与右归饮),每组样本数为 10。培养第 3、6、9 天收取细胞培养上清,1000g 离心 15min,分装后-20℃保存。

2.2 TPO 检测 实验前将各试剂放至室温平衡 30min,计算样品孔及标准品孔数,100μL/孔在相应孔中加入待测样品及标准品,摇匀,封膜后于 37℃孵育 2h,吸弃孔内液体,每孔加入生物素标记抗体工作液 100μL,37℃孵育 1h,弃去孔内液体,洗板 3 次,每孔加入辣根过氧化物酶亲和素标记工作液 100μL,37℃孵育 1h,洗板,加入显色液,显色终止后酶标仪读取 450nm 处 OD 值。

2.3 EPO 检测 实验前将各试剂放至室温平衡 30min,计算样品孔及标准品孔数,在相应孔中分别加入标准品 50μL、检测样本 50μL,每孔加入酶结合物 50μL,封板,37℃温育 1h,弃去孔内液体,去离子水洗板 3 次,每孔加入显色剂 A 液 50μL、显色剂 B 液 50μL,振荡混匀,37℃避光显色 15min,每孔加入终止液 50μL,酶标仪读取各孔 450nm OD 值。

2.4 统计学方法 实验数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,数据用 SPSS19.0 处理并作图,组间统计学分析采用 t-test 分析, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

3 实验结果

3.1 炙甘草汤、右归饮刺激脐静脉内皮细胞分泌 TPO 实验

基金项目:国家自然科学基金项目(81072728)

初期(第3天),所有实验组上清中均未检测到TPO的分泌;从第6天开始在所有实验组中开始检测到TPO的分泌,并且随着时间的增加TPO分泌量增加,第9天培养上清中TPO检测值为最高。统计学分析发现,在第6天,炙甘草汤组与空白对照组相比,TPO上升明显,右归饮组以及混合组与空白对照组相比无明显差异;第9天,炙甘草汤组与空白对照组相比TPO含量差异明显,同时混合组与空白对照组相比TPO表达也有明显差异,但右归饮组与空白对照组相比却表现出降低趋势。见表1。

表1 中药对脐静脉内皮细胞TPO表达水平的影响($\bar{x} \pm s$) pg/mL

组别	样本数	第3天	第6天	第9天
空白对照组	10	-	28.7±1.5	97.9±0.8
混合组	10	-	34.5±2.1	118.0±3.4**▲
右归饮组	10	-	25.8±1.5	79.9±2.2**
炙甘草汤组	10	-	68.5±1.9***	129.3±2.3***

注:“-”表示未检测到。与空白对照组相比,** $P < 0.005$,*** $P < 0.0005$ 。

3.2 炙甘草汤、右归饮刺激脐静脉内皮细胞分泌EPO 实验开始后第3天,所有实验组均未检测到EPO的分泌;第6天开始在右归饮组检测到EPO的分泌,但在空白对照组及另外两个加药组均未检测到EPO分泌;第9天与第6天结果类似,仅在右归饮组检测到EPO分泌。见表2。

表2 中药对脐静脉内皮细胞EPO表达水平的影响($\bar{x} \pm s$) mIU/mL

组别	样本数	第3天	第6天	第9天
空白对照组	10	-	-	-
混合组	10	-	-	-
右归饮组	10	-	1.476±0.050	5.730±0.228
炙甘草汤组	10	-	-	-

注:“-”表示未检测到。

4 讨论

促血小板生成素(thrombopoietin,TPO)是由332个氨基酸组成的多肽糖蛋白,是一种造血生长因子,目前认为它在体内的主要生理作用是刺激造血干细胞向巨核系祖细胞分化,并特异性地促进巨核系祖细胞增殖、分化,以及巨核细胞的成熟与释放血小板。研究显示,TPO单独或与早期作用的造血生长因子协同可有效维持原始造血细胞的存活并保留其再植活性,同时促进早期祖细胞的扩增^[5-6]。DeBruyn等^[7]研究也发现TPO单独使用可诱导CD34⁺细胞向CD41⁺细胞分化。这些研究均表明TPO在造血系统发育分化中具有重要作用。

促红细胞生成素(Erythropoietin,EPO)是一种唾液酸糖蛋白,其分子含196个氨基酸残基,成熟的EPO分子含166个氨基酸残基。红细胞的发育要经过干细胞、祖细胞、前体细胞、网织细胞等过程,其间必须要有相应的细胞因子作用细胞才能增殖、分化。促红细胞生成素是红细胞最重要的必不可少的细胞因子。它不仅刺激骨髓红系祖细胞的增殖、转化、成熟,使骨髓中网织红细胞生成并释放入血,而且可刺激血红蛋白的合成最终导致外周血红细胞数量的增加。EPO作为一种集落刺激因子已被人们广泛接受和认识,自1985

年EPO的cDNA被成功克隆后已成功应用于临床治疗血液系统疾病,可促进红系祖细胞增殖、分化和成熟。近年来发现EPO蛋白在胚胎、新生儿和成人脑脊液中均能检测到,并随年龄的增加而降低^[8]。

本实验通过炙甘草汤与右归饮体外刺激脐静脉内皮细胞的方法,探讨其造血因子的分泌情况,分析两种中药在造血相关发育分化中的作用。实验结果显示,两种中药在体外刺激脐静脉内皮细胞产生不同效应,炙甘草汤能够明显刺激脐静脉内皮细胞产生TPO,右归饮对脐静脉内皮细胞刺激产生TPO的效果却不明显,相反TPO的分泌反而下降,表现出一定的抑制效应。在混合组中当两种中药同时作用时,炙甘草汤的刺激作用与右归饮的抑制作用同时存在,炙甘草汤的刺激作用明显强于右归饮的抑制作用,最终刺激形成明显高于对照组的TPO分泌。由此可见,炙甘草汤能够明显刺激脐静脉内皮细胞分泌TPO。在刺激细胞产生EPO方面表现出相反的情况,炙甘草汤单独作用以及两种中药联合作用时效果均与空白对照相同,不能刺激细胞产生EPO,但右归饮单独作用时却能刺激细胞产生EPO。综合以上实验结果可以发现,两个中药方剂因所含成分不同,作用机制存在差异,刺激产生细胞因子的效果表现不同,另外两个方剂的治疗作用均表现出一定的持续性,随着时间增加刺激细胞因子的分泌也增多。

5 参考文献

- [1] 李晓璇,郭伟星.炙甘草汤治疗心血管疾病研究进展.山东中医杂志,2013,32(2):141
- [2] 邓中甲.方剂学.北京:中国中医药出版社,2003:31
- [3] 白蓝娜,刘莉,刘渊.炙甘草汤对心血管系统作用的研究进展.内蒙古中医药,2013(1):126
- [4] 李克松.右归饮抑制脑缺血糖皮质激素损伤海马神经元的研究.广东:广州中医药大学,2008
- [5] Kuter DJ,Begley CG.Recombinant human thrombopoietin:basic biology and evaluation of clinical studies.Blood,2002,100(10):3457
- [6] Luens KM,Travis MA,Chen BP,et al.Thrombopoietin,kit ligand, and flk2/flt3 ligand together induced increased numbers of primitive hematopoietic progenitors from human CD34⁺Thy-1⁺Lin⁻ cells with preserved ability to engraft SCID-hu bone.Blood,1998,91:1206
- [7] DeBruyn C,Delforge A,Martiat P,et al. Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitor cells:cord blood versus mobilized peripheral blood.Stem Cells Dev,2005,14(4):415
- [8] Juul S E,Harcum J,Li Y,et al. Erythropoietin is present in the cerebrospinal fluid of neonates.J Pediatr,1997,130:428

第一作者:马鹏(1980-),男,硕士研究生,研究方向:历代名医治疗难治性血液病的临床思维及经验研究。

通讯作者:刘渊,liuy60s@sina.com

收稿日期:2014-01-28

编辑:吴宁