# 术后康复汤对骨髓基质细胞增殖影响的实验研究

张　崴[1,2]　宋殿荣[1]　王建玲[1]　吴卫东[1]　王雅楠[1]　阳伟红[2]
(1.天津中医药大学第二附属医院,天津 300150; 2.天津中医药大学,天津 300193)

**摘　要**　目的:通过观察术后康复汤对小鼠骨髓基质细胞(BMSC)增殖的影响,研究该方提升腹部手术后患者血红蛋白含量的作用机理。方法:原代培养小鼠 BMSC,分别给予术后康复汤正常剂量含药血清、术后康复汤高剂量含药血清、空白血清和胎牛血清干预,MTT 法检测药物作用后 24h、48h、72h、96h BMSC 的吸光度值。结果:术后康复汤作用后 48h、72h、96h 骨髓基质细胞活细胞数量均明显高于空白血清组,与胎牛血清组比较差异无统计学意义。结论:术后康复汤可能通过促进 BMSC 增殖,参与造血调控,进而升高机体血红蛋白含量,促进术后患者康复,发挥益气养血的作用。

**关键词**　术后康复汤　骨髓基质细胞　细胞增殖　实验研究
**中图分类号**　R289.5　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1672-397X(2014)10-0075-02

红细胞是机体运输氧和二氧化碳,维持体液酸碱平衡的重要物质,红细胞的生理功能主要依靠血红蛋白实现。血红蛋白一旦减少,血液携氧能力减弱,全身各系统器官的功能均会受到危害。手术创伤、术中失血会导致血红蛋白下降,影响患者恢复。针对术后病人的一般状态,课题组拟定术后康复汤应用于临床,经随机对照临床研究显示该方具有益气养血的功效,能够迅速补充因失血造成的血红蛋白丢失,促进术后患者康复[1]。因此,本研究拟探讨术后康复汤益气养血作用机理,为其在临床的推广应用提供基础研究资料。

## 1　实验材料

1.1　动物　健康未交配 SD 大鼠,6~8 周龄,体重(200±20)g,购自中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所,动物许可证编号:SCXK(京)2009-0017。健康昆明种小鼠,6~8 周龄,体重(20±2)g,购自中国医学科学院放射医学研究所,动物许可证编号:SCXK(津)2010-001。

1.2　药材　中药饮片由天津中医药大学第二附属医院提供。

1.3　主要试剂　胎牛血清(FBS HyClone 公司),胰蛋白酶(0.25% Trypsin-EDTA Invitrogen 公司),谷氨酰胺(L-Glutamine,GIBCO 公司),青霉素、链霉素(GIBCO 公司),DMEM/F12(HyClone 公司),DMSO(SIGMA 公司),MTT(SIGMA 公司)。

1.4　主要仪器　酶标仪(GF-M3000),微型高速台式冷冻离心机(H-1600RW),电子分析天平(FA2004),旋转蒸发器(RE-5205),低温冷却液循环泵(DLSD-5725)。

## 2　实验方法

2.1　术后康复汤水煎液的制备　术后康复汤组成:黄芪 30g,当归 10g,大黄 6g,枳壳 12g,厚朴 12g,炒莱菔子 10g,丹参 15g,赤芍 10g,败酱草 30g,白花蛇舌草 30g。经浸泡、旋蒸、浓缩、定容至 1g 药材/mL,分装,4℃冷藏,备用。

2.2　分组和给药方案　将 SD 大鼠随机分为空白组、术后康复汤正常剂量组和术后康复汤高剂量组,每组 30 只。正常剂量组,相当于临床用量的等效剂量,即术后康复汤 14.85g/kg;高剂量组,相当于 5 倍临床用量,即术后康复汤 74.25g/kg;空白组,给予等体积生理盐水。各组均灌胃给药,2 次/d,连续 5d。

2.3　含药血清制备　末次灌胃后 1h,腹主动脉取血,静置,离心 3000r/min,10min,取上清,56℃水浴灭活 30min,0.22μm 微孔滤器过滤,备用。

2.4　骨髓基质细胞(BMSC)培养　颈椎脱臼处死小鼠,取股骨,去除骨表面肌肉和筋膜,剪去双侧股骨骨骺端,1mL 注射器抽取预冷的全培基(含 10%FBS、1%双抗、DMEM/F12)反复冲洗骨髓腔,冲洗液置于无菌培养皿。收集细胞,吹打成单细胞悬液,静置,取上清,4℃ 800r/min 离心 10min,弃上清,全培基重悬细胞,接种至 T75 培养瓶,5%$CO_2$,37℃,饱和湿度培养箱中培养。

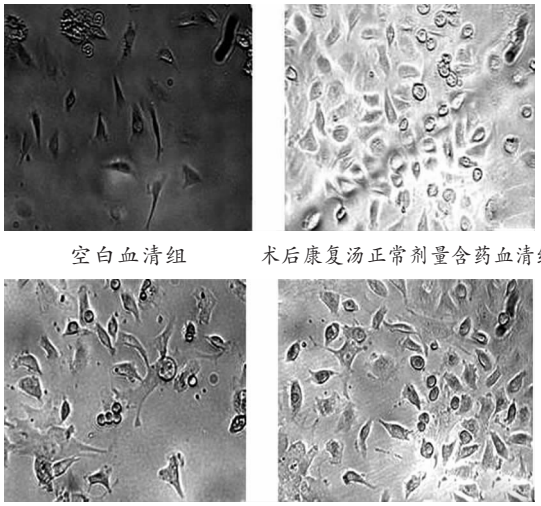
2.5　MTT 法检测术后康复汤含药血清对 BMSC 增殖的影响　将 BMSC 以 $5\times10^6$ 个/mL 密度接种于 96 孔板。细胞贴壁后,吸弃培养液,分别加入 10%空白血清、10%术后康复汤正常剂量含药血清、10%术后康复汤高剂量含药血清和 10%胎牛血清。MTT 检测细胞生长 24h、48h、72h、96h 570nm 处吸光度值(OD 值)。以时间为横轴,OD 值为纵轴,绘制细胞生长曲线。

2.6　统计学方法　计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS17.0 医学统计学软件处理,采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

基金项目:天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题(11057)

## 3 实验结果

3.1 术后康复汤含药血清干预后 BMSC 形态学变化 空白血清组细胞轻度增殖，胞体增大不明显；术后康复汤正常剂量含药血清组、高剂量含药血清组和胎牛血清组细胞增殖显著，胞体饱满，折光性强，颗粒感明显。见图 1。



空白血清组　术后康复汤正常剂量含药血清组

术后康复汤高剂量含药血清组　胎牛血清组

图 1 不同血清作用 72h 后 BMSC 形态(400×)

3.2 术后康复汤含药血清对 BMSC 增殖影响 24h、48h、72h、96h 各时间点，不同剂量术后康复汤含药血清作用下 BMSC，随时间延长 OD 值均呈上升趋势。24h，空白血清组、术后康复汤正常剂量含药血清组、术后康复汤高剂量含药血清组、胎牛血清组组间比较差异无统计学意义($P$>0.05)。48h、72h、96h，术后康复汤正常剂量含药血清组和高剂量含药血清组 OD 值均明显高于空白血清组($P$<0.05)，与胎牛血清组比较差异无统计学意义($P$>0.05)。各时间点，术后康复汤不同剂量组组间比较差异无统计学意义($P$>0.05)。见表 1。

表 1 各组不同时间点 BMSC 的吸光度值比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | OD 值(24h) | OD 值(48h) | OD 值(72h) | OD 值(96h) |
|---|---|---|---|---|
| 空白血清组 | 0.153±0.004 | 0.210±0.003 | 0.369±0.002 | 0.501±0.011 |
| 术后康复汤正常剂量含药血清组 | 0.154±0.003 | 0.235±0.003# | 0.520±0.011# | 0.655±0.016# |
| 术后康复汤高剂量含药血清组 | 0.154±0.004 | 0.234±0.004# | 0.522±0.014# | 0.662±0.007# |
| 胎牛血清组 | 0.156±0.005 | 0.249±0.038# | 0.531±0.011# | 0.658±0.010# |

注：与空白血清组比较，#$P$<0.05。

## 4 讨论

手术属于中医学金刃伤范畴，为三因学说的不内外因。手术本身在祛邪的同时，也耗伤了人体的正气，使术后患者出现邪去而正未安的病理状态，临床表现为气血两虚。气在表护卫皮毛，充实腠理，使人有抗邪能力；在内导行血脉，升降阴阳，周流一身。不论外感还是内伤都有气的病理现象，故有“百病皆生于气”之论，气充则强，气少则虚，气顺则平，气逆则病。血液循行体内，营养周身，如有亏乏、凝滞、妄行均为病症。术后患者的诸多病理变化均与气血两虚相关，治疗宜以补益气血为首。术后康复汤方中黄芪、当归共为君药，黄芪补气生阳，是补气药物之最，与当归补气和血相配伍，可助阳生阴长，气血两旺。黄芪、当归是常见的气血双补药对，多项研究表明黄芪、当归合用具有补气养血的作用[2-5]。

现代医学研究表明，骨髓基质细胞(BMSC)参与构成造血微环境[6]，是造血干细胞生长、分化和自我更新的重要场所。研究发现，造血细胞的生长有赖于多种基质细胞组成的黏附层，缺乏 BMSC，造血干细胞在体外不能持续生长，表明 BMSC 对造血干细胞的自我更新及快速增殖具有重要作用[7]。一方面，BMSC 通过与造血细胞密切接触而起到支持和营养造血实质细胞的作用；另一方面 BMSC 表达多种黏附分子，通过黏附分子与造血细胞间产生信息传递，调节造血细胞的增殖与分化，保持造血干细胞池有序造血。此外，BMSC 还可以合成多种造血正负调控因子，发挥高效调控作用，维持机体造血的动态平衡[8]。

本研究表明，术后康复汤正常剂量含药血清和高剂量含药血清作用 48h、72h、96h 后，BMSC 活细胞数量均明显高于空白血清组，且与胎牛血清组比较差异无统计学意义，提示术后康复汤可促进骨髓基质细胞增殖，参与造血调控，进而升高机体血红蛋白含量，促进术后患者康复，发挥益气养血的作用。但是术后康复汤通过促进 BMSC 增殖，参与造血调控的机制及作用靶点尚有待进一步研究。

## 5 参考文献


[1] 宋殿荣，王建玲，王瑞，等.自拟术后康复汤促进妇科术后恢复的临床观察.天津中医药，2009，26(4)：277

[2] 薛亮，郭茂娟，范英昌.当归补血汤立法理论及配伍应用的探析.天津中医药，2010，21(7)：28

[3] 严苏纯，祝彼得，韩英光，等.当归补血汤不同制剂对骨髓抑制小鼠造血调控的实验研究.天津中医药，2008，25(3)：229

[4] 王惠敏，赵玉娟，吴胜群，等.“补天"中药静脉制剂对急性贫血大鼠红细胞免疫功能影响的观察. 天津中医药大学学报，2005，24(2)：70

[5] 胡杨洋，陈锐娥，王胜鹏，等.中药药对的系统研究(Ⅵ)：黄芪当归药对研究.世界科学技术—中医药现代化，2012，14(2)：1349

[6] 王彩霞，崔明玉.骨髓基质细胞对造血调控的研究进展. 内蒙古医学杂志，2007，39(7)：826

[7] Ueno H，Sakita -Ishikawa M，Morikawa Y，et al.A stromal cellerived membrane protein that supports hematopoietic stem cells . Natimmunol，2003，4(5)：457

[8] Cheng LM，Yan Y，Wang QR.Eexpression of hematopoietic inhibitory Factors in mouse fibroblasts，macrophages and endothelial cells.Cel Biol Int，2003，27(9)：739



**第一作者**：张崴(1978-)，女，医学硕士，主治医师，中西医结合妇科专业。

**通讯作者**：宋殿荣，songdr58@126.com



收稿日期：2014-05-29

编辑：吴　宁