

· 重大新药创制专项巡礼 ·

强骨生血口服液对小鼠化疗后骨髓抑制的保护作用及机制研究

罗桂芳^{1,2}, 唐娅辉^{2,3}, 吴莉峰^{2,3}, 刘锐⁴, 许志⁴, 曾贵荣², 信红亚¹

(1 中南大学湘雅医院血液科, 长沙 410008; 2 湖南省药物安全评价研究中心 & 新药药效与安全评价湖南省重点实验室, 长沙 410331; 3 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 长沙 410208; 4 湖南天劲制药有限责任公司, 长沙 410205)

[摘要] 目的: 研究强骨生血口服液对小鼠化疗后骨髓抑制的保护作用及机制。方法: SPF 级 BALB/c 小鼠 192 只, 雌雄各半, 体重 20 ~ 25 g, 随机分为正常对照组、模型对照组、当归补血口服液组、强骨生血口服液低、中、高剂量组 6 组, 每组 32 只。各组小鼠按 20 mL·kg⁻¹ 灌胃 (ig) 给予相应剂量药液或纯化水, 连续 31 d。给药期间除正常对照组外, 其余各组动物采用乙酰苯肼 (APH) 和环磷酰胺 (CP) 联用诱导骨髓抑制模型。分别于给药后 d 11、d 18、d 25 和 d 32 各组随机取 8 只动物眼眶采血, 进行血常规指标检测; 取股骨骨髓进行有核细胞计数, 用流式细胞术检测有核细胞的细胞周期; 取另一侧股骨骨髓, 采用 ELISA 法检测骨髓组织血管内皮生长因子 (VEGF)、血小板内皮细胞黏附分子 (PECAM-1) 的含量; 采用 Western Blot 检测骨髓中 VEGF 和 PECAM-1 的表达。结果: 强骨生血口服液能增加正常小鼠外周血中 HGB 含量, 并能显著增加 APH-CP 诱导的复合型小鼠骨髓抑制模型的 HGB、PLT 数量、RET 比例、骨髓细胞有核细胞数 ($P < 0.05$), 能显著改善 APH-CP 所致的小鼠骨髓中 VEGF 和 PECAM-1 含量下降及 VEGF 和 PECAM-1 蛋白表达下调情况 ($P < 0.05$), 能显著改善 APH-CP 对小鼠骨髓 G₀/G₁ 期阻滞, 促进有核细胞进入 S 期及 G₂/M 期, 促进细胞分裂, 增强造血功能。结论: 强骨生血口服液小鼠化疗后骨髓抑制具有明显保护作用, 其机制与增加骨髓细胞因子 VEGF 和 PECAM-1 表达, 调节骨髓微环境有关。

[关键词] 强骨生血口服液; 骨髓抑制; 微环境

[中图分类号] R96 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2017)22-2664-08

Protective effects of Qianggushengxue oral liquid on chemotherapy-induced bone marrow suppression in mice

LUO Gui-fang^{1,2}, TANG Ya-hui^{2,3}, WU Li-feng^{2,3}, LIU Yue⁴, XU Zhi⁴, ZENG Gui-rong², XIN Hong-ya¹

(1 Department of Haematology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

2 Hunan Center of Drug Safety Evaluation and Research of Drugs & Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331, China; 3 Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Power and Innovative Drugs of Hunan, Changsha 410208, China;

4 Hunan Tianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410205, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of Qianggushengxue oral liquid (QGSX) on chemotherapy-induced bone marrow suppression in mice. **Methods:** A total of 192 BALB/c mice with body weight of 20 ~ 25 g were randomly divided into 6 groups: sham, model group, three QGSX-treatment groups of different doses (3.9, 7.8, 15.6 mL·kg⁻¹) and a positive drug group treated with Dangguibuxue oral liquid (2.6 mL·kg⁻¹). All animals were orally treated with respective drugs or water once each day for 31 d. In the period of the

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2011ZX09401); 新药药效与安全评价湖南省重点实验室开放性课题(201602)

[作者简介] 罗桂芳, 男, 实习研究员, 主要从事血液药理学研究。联系电话: (0731) 83285167, E-mail: luoguifang@hnsc.org。

[通讯作者] 信红亚, 女, 博士, 主治医师, 主要从事临床血液学研究。联系电话: (0731) 83285167, E-mail: xinhongya@163.com。



experiments, except the normal group, bone marrow suppression were induced in the animals in the other 5 groups by combined treatment with acetylphenylhydrazinem (APH) and cyclophosphamide (CP). On the 11th, 18th, 25th and 32th days, 8 animals in each group were executed respectively to collect blood samples for blood routine examination and to gather femoral bone marrow for nucleated cell count and cell cycle. The contents and protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet endothelial cell adhesion molecules (PECAM-1) were examined by ELISA and Western blotting respectively in femoral bone marrow. **Results:** QGSX could significantly increase the content of HGB in normal mice and inhibit the decrease in the contents of HGB, PLT and RET ratio in APH-CP-treated mice. Also, QGSX could attenuate the decrease in nucleated cell count and promote the transformation of nucleated cells into S and G₂/M cycles. Furthermore, QGSX could increase both the contents and the protein expression of VEGF and PECAM-1 in APH-CP-treated mice. **Conclusion:** QGSX exhibits protective effects on chemotherapy-induced bone marrow suppression in mice, and its actions are related to the increase in the content of cytokines and modulation of bone marrow microenvironment.

[Key words] Qianggushengxue oral liquid; bone marrow suppression; microenvironment

化疗后骨髓抑制是导致肿瘤患者易感染的主要因素。如何预防和治疗化疗药物所致的骨髓抑制对改善肿瘤患者生活质量,延长生存时间具有重要作用^[1]。目前改善血常规指标的药物主要是升白细胞或者是改善血红蛋白和红细胞,而对两者兼有疗效的药物缺乏。强骨生血口服液由骨液、党参、黄芪、灵芝、大枣、黑木耳等药组成,适用于缺铁性贫血、骨质疏松等适应证。近年来临床应用发现,强骨生血口服液对肿瘤化疗患者具有改善血象的作用,但未见系统研究。本研究采用环磷酰胺(CP)和乙酰苯肼(APH)联用诱导小鼠骨髓抑制模型,观察强骨生血口服液对骨髓抑制的预防和治疗作用,并初步探讨其作用机制。

材料与方法

1 药物与试剂

强骨生血口服液(QGSX,湖南天劲制药有限公司,批号:160966,规格:10 mL/10支),主要成份为:骨液、党参、黄芪、灵芝、大枣、黑木耳,具有益气生血、滋补肝肾、填髓壮骨等功效,临床使用剂量为:成人每次10 mL tid;阳性对照药:当归补血口服液(郑州市协和制药厂,批号:20151005,规格:每盒10 mL×20支,有效期至2017年9月);乙酰苯肼(APH,上海三爱思试剂有限公司,批号:107003);环磷酰胺(Sigma公司,批号:079K1569);血管内皮生长因子(VEGF,批号:201610)、血小板内皮细胞黏附分子(PECAM-1)试剂盒(批号:201610)(美国R&D公司产品);兔来源VEGF抗体(批号:GR121524-1)、兔来源PECAM-1抗体(批号:GR128314-1)(美国Sigma

公司)。

2 实验动物

BALB/c小鼠240只,雌雄各半,SPF级,使用时体重范围:20~25 g,动物合格证号:43004700024910,湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2011-0003;在湖南省药物安全评价研究中心屏障环境饲养,实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2015-0016。

3 主要仪器

AUY-220分析天平(日本岛津公司产品);Accuri C6流式细胞仪(美国BD公司);MR-96A酶标仪(深圳迈瑞公司);BC-5500五分类血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);PowerPac™ Basic电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

4 实验分组及给药

选取检疫合格的BALB/c小鼠192只,雌雄各半,体重20.9~25.2 g,按性别体重随机分为6组,分别为正常对照组、模型对照组、当归补血口服液组(2.6 mL·kg⁻¹)、强骨生血口服液低、中、高剂量组(3.9, 7.8和15.6 mL·kg⁻¹),以70 kg成人、30 mL·d⁻¹计,按体表面积法换算分别相当于临床剂量的1/2和4倍,每组32只动物。每日给药前将当归补血口服液、强骨生血口服液用纯化水配制成相应浓度药液:当归生血口服液为0.13 mL·mL⁻¹,强骨生血口服液低、中、高剂量分别为1.95, 3.9和7.8 mL·mL⁻¹。各组小鼠按20 mL·kg⁻¹灌胃(ig)给予相应剂量药液,qd,连续31 d,正常对照组和模型对照组ig给予等体积纯化水。除正常对照组外,其余各组小鼠于给药d11和d14给药前(即前1 d给药

24 h 后),分别皮下注射 20 和 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的乙酰苯肼(APH),同时除正常对照组小鼠外,各组小鼠分别于给药 d 14 起,在前 1 d 给药 24 h 后连续 3 d 腹腔注射 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的环磷酰胺^[2-4]。分别于 d 10, d 17, d 24 和 d 31 给药 24 h 后,即 D₁₁, D₁₈, D₂₅ 和 D₃₂,从各组中随机选取 8 只小鼠,雌雄各半,采血及取股骨骨髓进行检测。

5 外周血常规检测

小鼠眼眶静脉丛取血,采用血球分析仪测定血常规指标:白细胞(WBC)计数、血小板(PLT)计数、红细胞(RBC)计数、网织红细胞(RET)计数、血红蛋白浓度(HGB)。

6 骨髓组织检查

动物行 CO₂ 麻醉安乐死,取双侧股骨骨髓,各以 1 mL 0.9% NaCl 溶液冲出骨髓细胞,制成单个骨髓细胞悬液,取 5 μL 骨髓细胞悬液制备骨髓涂片,瑞氏-吉姆萨染色液染色,于 10 × 10 倍显微镜下采用白细胞计数法观察有核细胞数(BMC);用流式细胞术检测骨髓细胞周期变化(G₀, G₁, S, G₂ 和 M

期),观察细胞增殖情况。用 ELISA 法检测上清液中 VEGF 和 PECAM-1 的水平;用 Western Blot 法检测骨髓细胞沉淀中 VEGF 和 PECAM-1 的蛋白表达水平。

7 统计学处理

本试验数据统计采用 SPSS 16.0。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行正态性和方差齐性检验。如果满足正态性($P > 0.05$),用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析,并根据方差齐性情况选用 LSD + Dunnet(方差齐)进行比较分析。 $P \leq 0.05$ 表示有统计学意义。

结 果

1 QGSX 对 APH-CP 诱导的小鼠骨髓抑制模型外周血常规的影响

如表 1 所示,造模前(D₁₁)与正常对照组比较,3 个剂量的 QGSX 给药 10 d 能显著增加正常动物 HGB 的含量,且中、高剂量能显著增加 WBC 计数。QGSX 对正常动物 RBC、PLT 和 RET 无明显影响。

表 1 QGSX 对 APH-CP 诱导的小鼠骨髓抑制模型外周血常规的影响

$n = 8, \bar{x} \pm s$

时间	指标	正常对照组	模型对照组	阳性对照组 (2.6 mL·kg ⁻¹)	QGSX 组		
					3.9 mL·kg ⁻¹	7.8 mL·kg ⁻¹	15.6 mL·kg ⁻¹
D ₁₁	WBC/10 ⁹ 个·mL ⁻¹	5.19 ± 1.68	5.93 ± 2.82	4.64 ± 2.41	5.28 ± 1.51	6.74 ± 1.29 ^c	6.48 ± 1.42 ^c
	RBC/10 ¹² 个·mL ⁻¹	9.22 ± 0.75	9.16 ± 0.38	9.39 ± 0.70	9.59 ± 0.47	10.16 ± 1.52	9.68 ± 0.39
	HGB/g·L ⁻¹	156 ± 15	150 ± 20	170 ± 12 ^d	169 ± 11 ^d	175 ± 12 ^d	172 ± 8 ^d
	PLT/10 ⁹ 个·mL ⁻¹	757 ± 230	605 ± 134	593 ± 156	681 ± 147	650 ± 256	661 ± 200
	RET/%	1.69 ± 0.67	2.20 ± 1.19	2.24 ± 1.09	1.64 ± 0.86	2.18 ± 0.84	1.50 ± 0.81
D ₁₈	WBC/10 ⁹ 个·mL ⁻¹	4.62 ± 2.06	1.36 ± 0.56 ^b	1.37 ± 0.57	1.50 ± 0.53	1.66 ± 0.72	1.77 ± 0.51 ^c
	RBC/10 ¹² 个·mL ⁻¹	8.95 ± 0.47	6.44 ± 1.06 ^b	6.09 ± 0.75	6.15 ± 1.13	6.54 ± 0.40	6.47 ± 0.63
	HGB/g·L ⁻¹	171 ± 24	137 ± 8 ^b	165 ± 11 ^d	170 ± 21 ^d	173 ± 9 ^d	181 ± 10 ^d
	PLT/10 ⁹ 个·mL ⁻¹	1 112 ± 185	898 ± 105 ^b	1 130 ± 240 ^d	972 ± 250	1 169 ± 293 ^c	1 291 ± 232 ^c
	RET/%	2.03 ± 0.75	0.43 ± 0.36 ^b	1.35 ± 1.00 ^d	0.85 ± 0.46 ^c	0.90 ± 0.69 ^c	1.53 ± 1.04 ^d
D ₂₅	WBC/10 ⁹ 个·mL ⁻¹	4.99 ± 1.37	3.38 ± 0.60 ^b	3.49 ± 0.63	4.24 ± 0.84	4.06 ± 0.82	4.35 ± 0.82
	RBC/10 ¹² 个·mL ⁻¹	8.72 ± 0.33	6.91 ± 0.29	6.99 ± 0.48	7.19 ± 0.62	7.20 ± 0.45	7.50 ± 0.79
	HGB/g·L ⁻¹	163 ± 12	133 ± 6 ^a	167 ± 14 ^d	154 ± 15 ^d	173 ± 10 ^d	167 ± 14 ^c
	PLT/10 ⁹ 个·mL ⁻¹	1 496 ± 213	862 ± 78 ^b	1 394 ± 264 ^d	1 589 ± 405 ^d	1 402 ± 411 ^d	1 527 ± 301 ^d
	RET/%	1.61 ± 1.19	1.29 ± 0.49	2.21 ± 0.93 ^d	3.23 ± 1.48 ^d	2.07 ± 1.16 ^c	2.71 ± 1.52 ^d
D ₃₂	WBC/10 ⁹ 个·mL ⁻¹	5.18 ± 3.04	5.10 ± 1.25	5.31 ± 1.09	5.33 ± 2.13	5.70 ± 1.28	7.35 ± 2.02 ^c
	RBC/10 ¹² 个·mL ⁻¹	8.70 ± 0.38	7.75 ± 0.35	7.76 ± 0.26	8.00 ± 0.27	7.94 ± 0.35	7.92 ± 0.26
	HGB/g·L ⁻¹	154 ± 5	143 ± 6	154 ± 6	157 ± 3	155 ± 6	156 ± 6
	PLT/10 ⁹ 个·mL ⁻¹	877 ± 93	986 ± 155	920 ± 156	920 ± 116	936 ± 130	882 ± 167
	RET/%	2.12 ± 1.20	2.51 ± 1.37	2.61 ± 1.45	3.18 ± 1.36 ^c	3.34 ± 0.71 ^c	3.82 ± 1.73 ^d

与正常对照组比较 a: $P < 0.05$ b: $P < 0.01$; 与模型对照组比较 c: $P < 0.05$ d: $P < 0.01$

APH-CP 联合造模后 d 1 (D_{18}) ,与正常对照组比较 模型组 WBC ,RBC ,HGB ,PLT 和 RET 均显著下降 ($P < 0.01$) 。与模型对照组比较 3 个剂量 QGSX 组 HGB 含量和 RET% 均显著增加 ,中、高剂量 QGSX 组 PLT 计数显著增加 ,高剂量 QGSX 组 WBC 计数显著增加。

APH-CP 联合造模后 d 7 (D_{25}) ,与正常对照组比较 模型组 WBC ,HGB 和 PLT 均显著下降 ($P < 0.01$) 。与模型对照组比较 3 个剂量 QGSX 组 HGB 含量、PLT 计数和 RET% 均显著增加。

APH-CP 联合造模完后 d 14 (D_{32}) ,与正常对照

组比较 模型组 WBC ,RBC ,HGB ,PLT 和 RET 均未有显著性差异。与模型对照组比较 3 个剂量 QGSX 组 RET% 均显著增加。

2 QGSX 对 APH-CP 诱导的小鼠骨髓抑制模型骨髓有核细胞数和细胞周期的影响

如表 2 所示 造模前 (D_{11}) 与正常对照组比较 , 3 个剂量的 QGSX 给药 10 d 对骨髓有核细胞数无明显影响。APH-CP 联合造模后 d 1 ,d 7 和 d 14 (D_{18} , D_{25} 和 D_{32}) ,与正常对照组比较 模型组骨髓有核细胞均数显著下降 ($P < 0.01$) 。与模型对照组比较 3 个剂量 QGSX 组骨髓有核细胞数均显著增加。

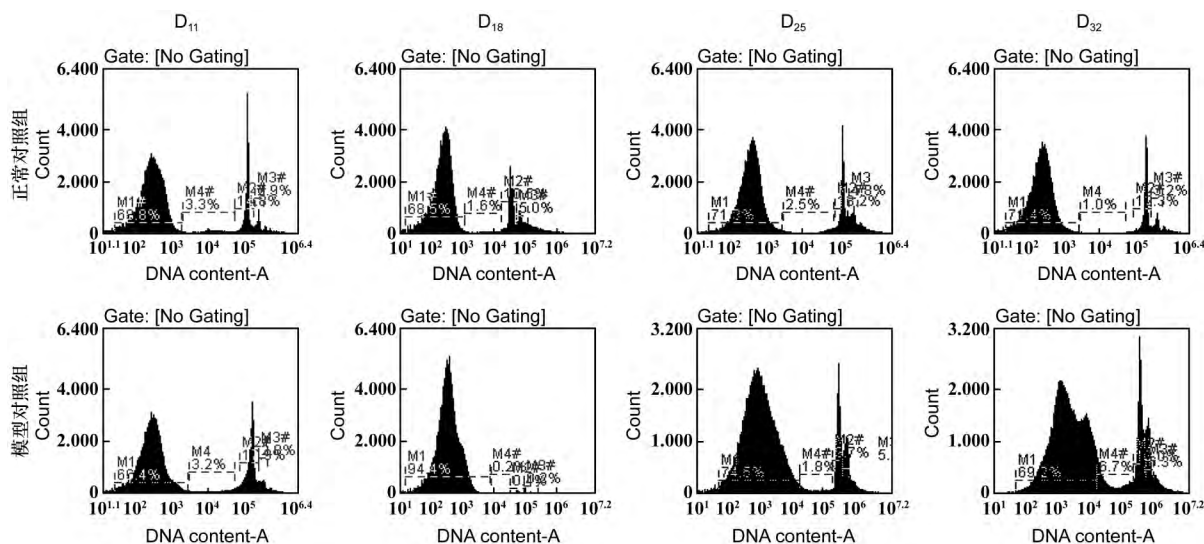
表 2 QGSX 对 APH-CP 诱导的小鼠骨髓抑制模型骨髓有核细胞数的影响 $n = 8 \bar{x} \pm s$

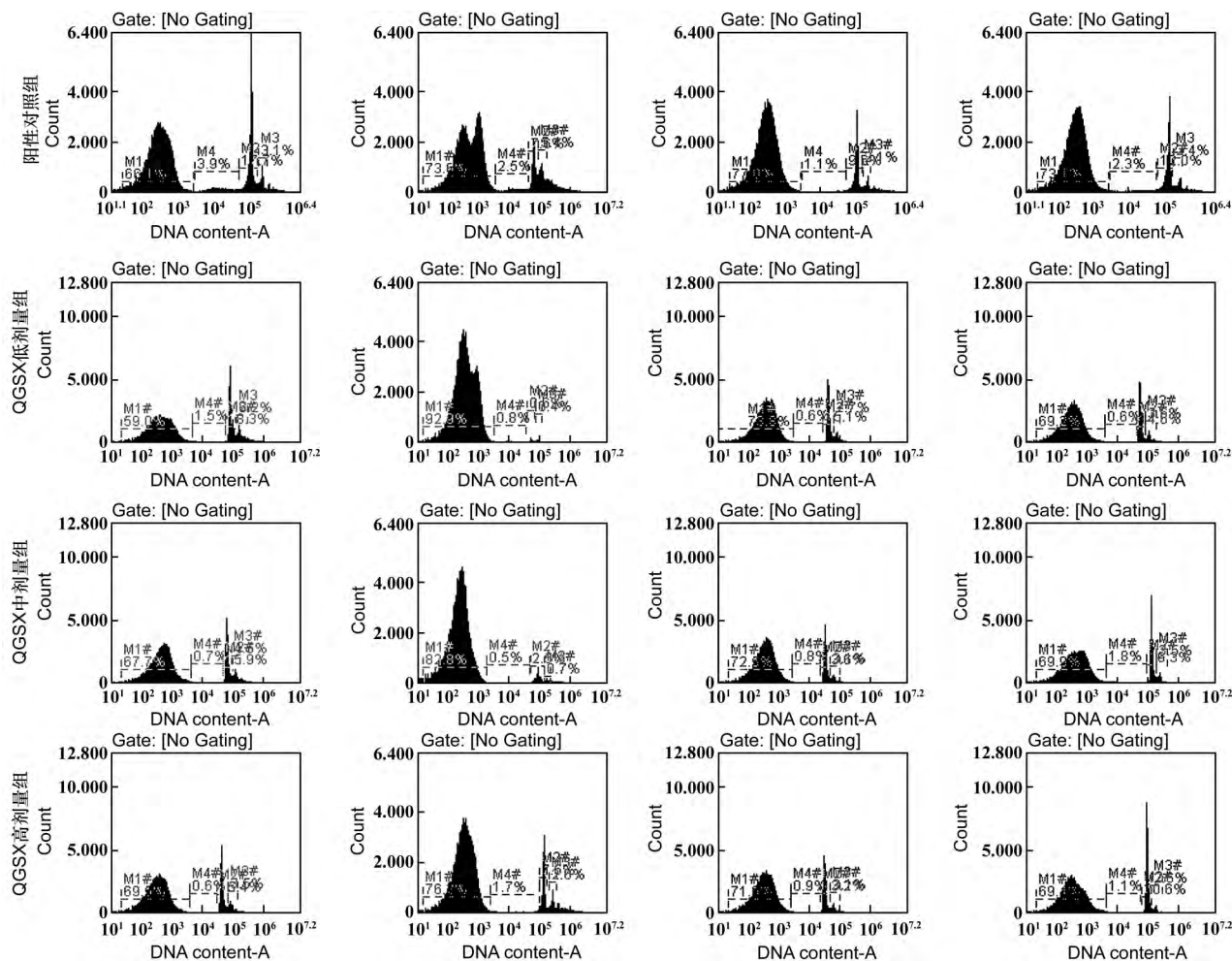
组别	剂量 /mL·kg ⁻¹	有核细胞数/ 10^6 个			
		D_{11}	D_{18}	D_{25}	D_{32}
正常对照组	—	3.13 ± 0.44	3.25 ± 0.36	3.76 ± 0.47	3.18 ± 0.44
模型对照组	—	3.07 ± 0.43	1.16 ± 0.45 ^a	1.14 ± 0.22 ^a	0.92 ± 0.48 ^a
阳性对照组	2.6	2.70 ± 0.50	2.29 ± 0.32 ^b	2.13 ± 0.40 ^b	2.18 ± 0.58 ^b
QGSX 低剂量组	3.9	3.29 ± 0.48	2.70 ± 0.70 ^b	2.49 ± 0.41 ^b	3.08 ± 1.05 ^b
QGSX 中剂量组	7.8	3.24 ± 0.36	3.38 ± 1.03 ^b	3.26 ± 0.84 ^b	3.45 ± 0.96 ^b
QGSX 高剂量组	15.6	3.12 ± 0.66	3.97 ± 0.51 ^b	3.78 ± 0.61 ^b	4.21 ± 0.97 ^b

与正常对照组比较 , a: $P < 0.01$; 与模型对照组比较 b: $P < 0.01$

如图 1 和表 3 所示 连续给药 10 d (D_{11}) ,正常对照组、模型对照组、强骨生血口服液低、中、高剂量组小鼠骨髓细胞 G_0/G_1 期、 G_2/M 期、S 期细胞数、 G_2/M 期和 S 期细胞比例均无明显差异 ,表明强骨生血口服液对正常小鼠细胞周期无明显影响。APH-CP 联合造模后 d 1 (D_{18}) ,与正常对照组比较 ,模型对照组小鼠骨髓细胞 G_0/G_1 期数显著增加

($P < 0.01$) , G_2/M 期细胞数减少 ($P < 0.01$) , G_2/M 细胞比例均显著降低 ($P < 0.01$) ;与模型对照组比较 强骨生血口服液高剂量组小鼠骨髓 G_2/M 期细胞数增加 ($P < 0.01$) , G_2/M 细胞比例均显著升高 ($P < 0.01$) 。造模结束后连续给药 d 7 和 d 14 (D_{25} 和 D_{32}) ,各组小鼠骨髓细胞 G_0/G_1 期、 G_2/M 期、S 期细胞数、 G_2/M 期和 S 期细胞比例均无明显差异。





QGSX 表示强骨生血口服液组; M_1 表示细胞处于 G_0/G_1 期, M_2/M_3 表示细胞处于 G_2/M 期, M_4 表示细胞处于 S 期

图1 QGSX 对 APH-CP 诱导的小鼠骨髓抑制模型骨髓细胞周期的影响

表3 QGSX 对 APH-CP 诱导的小鼠骨髓抑制模型骨髓细胞周期的影响

$n = 8 \quad \bar{x} \pm s$

时间	细胞周期指标	正常对照组	模型对照组	阳性对照组 (2.6 mL·kg ⁻¹)	QGSX 组		
					3.9 mL·kg ⁻¹	7.8 mL·kg ⁻¹	15.6 mL·kg ⁻¹
D ₁₁	G_0/G_1 期/ 10^4 个	6.16 ± 1.33	7.40 ± 0.43	7.03 ± 0.54	7.27 ± 1.02	6.95 ± 2.46	6.76 ± 1.31
	G_2/M 期/ 10^4 个	5.38 ± 0.38	5.27 ± 0.31	5.23 ± 0.51	5.02 ± 0.71	5.14 ± 0.76	5.11 ± 0.52
	S 期/ 10^4 个	0.18 ± 0.08	0.22 ± 0.09	0.19 ± 0.13	0.14 ± 0.10	0.18 ± 0.12	0.15 ± 0.05
	G_2/M 期比例/%	0.465 ± 0.066	0.409 ± 0.024	0.420 ± 0.040	0.404 ± 0.034	0.441 ± 0.152	0.429 ± 0.053
	S 期比例/%	0.015 ± 0.007	0.017 ± 0.007	0.016 ± 0.010	0.011 ± 0.008	0.015 ± 0.009	0.012 ± 0.004
D ₁₈	G_0/G_1 期/ 10^4 个	3.21 ± 0.31	7.89 ± 0.61 ^a	7.47 ± 0.78	8.00 ± 0.85	7.90 ± 0.90	7.83 ± 0.31
	G_2/M 期/ 10^4 个	6.09 ± 0.32	1.12 ± 0.30 ^a	1.81 ± 0.70 ^b	1.32 ± 0.63	1.57 ± 0.83	2.14 ± 0.57 ^c
	S 期/ 10^4 个	0.19 ± 0.08	0.24 ± 0.08	0.20 ± 0.06	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.05	0.25 ± 0.09
	G_2/M 期比例/%	0.642 ± 0.035	0.121 ± 0.032 ^a	0.191 ± 0.075 ^b	0.138 ± 0.061	0.161 ± 0.085	0.207 ± 0.045 ^c
	S 期比例/%	0.021 ± 0.008	0.026 ± 0.010	0.021 ± 0.006	0.021 ± 0.005	0.020 ± 0.006	0.025 ± 0.010
D ₂₅	G_0/G_1 期/ 10^4 个	3.16 ± 0.90	3.11 ± 0.64	3.52 ± 1.02	3.94 ± 1.34	4.23 ± 1.52	4.26 ± 1.13
	G_2/M 期/ 10^4 个	5.63 ± 1.00	4.76 ± 1.02	4.78 ± 1.29	4.60 ± 1.41	4.35 ± 1.68	5.27 ± 1.16
	S 期/ 10^4 个	0.30 ± 0.03	0.35 ± 0.08	0.34 ± 0.05	0.48 ± 0.05	0.44 ± 0.11	0.40 ± 0.09
	G_2/M 期比例/%	0.619 ± 0.097	0.576 ± 0.058	0.550 ± 0.126	0.509 ± 0.148	0.480 ± 0.175	0.531 ± 0.113
	S 期比例/%	0.033 ± 0.004	0.044 ± 0.012	0.039 ± 0.005	0.053 ± 0.005	0.048 ± 0.010	0.041 ± 0.008

续表 3

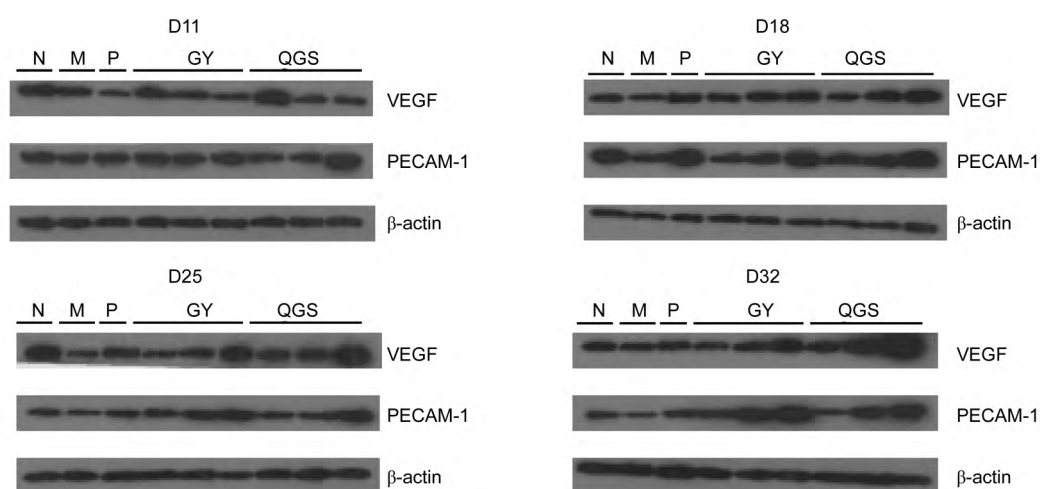
时间	细胞周期指标	正常对照组	模型对照组	阳性对照组 (2.6 mL·kg ⁻¹)	QGSX 组		
					3.9 mL·kg ⁻¹	7.8 mL·kg ⁻¹	15.6 mL·kg ⁻¹
D ₃₂	G ₀ /G ₁ 期/10 ⁴ 个	4.62 ± 2.27	5.57 ± 1.54	5.26 ± 1.71	5.21 ± 1.81	5.93 ± 1.44	5.82 ± 2.32
	G ₂ /M 期/10 ⁴ 个	5.10 ± 1.69	3.93 ± 1.10	4.46 ± 0.58	3.59 ± 1.71	3.36 ± 1.34	4.99 ± 1.53
	S 期/10 ⁴ 个	0.20 ± 0.13	0.30 ± 0.17	0.28 ± 0.17	0.25 ± 0.11	0.20 ± 0.08	0.25 ± 0.21
	G ₂ /M 期比例/%	0.523 ± 0.185	0.404 ± 0.109	0.455 ± 0.076	0.400 ± 0.185	0.353 ± 0.125	0.455 ± 0.097
	S 期比例/%	0.021 ± 0.014	0.031 ± 0.016	0.028 ± 0.014	0.027 ± 0.010	0.021 ± 0.009	0.026 ± 0.022

与正常对照组比较 a: $P < 0.01$; 与模型对照组比较 b: $P < 0.05$ c: $P < 0.01$

3 QGSX 对 APH-CP 诱导的小鼠骨髓抑制模型骨髓 VEGF 和 PECAM-1 的影响

如图 2 和表 4 所示,连续给药 10 d(D₁₁),各组小鼠骨髓组织 VEGF 含量无明显差异;造模结束后

(D₁₈)、造模结束后连续给药 d 7 和 d 14(D₂₅和 D₃₂)模型对照组小鼠 VEGF 含量和蛋白表达显著减少,强骨生血口服液、高剂量组小鼠 VEGF 含量和蛋白表达均显著增加。



M: 模型对照组(model control); N: 正常对照组(nominal control); P: 阳性对照组(positive control); QGSX: 强骨生血口服液组

图 2 QGSX 对 APH-CP 诱导的小鼠骨髓抑制模型骨髓组织 VEGF 和 PECAM-1 蛋白表达的影响

表 4 QGSX 对 APH-CP 诱导的小鼠骨髓抑制模型骨髓 VEGF 和 PECAM-1 的影响 $n = 8$ $\bar{x} \pm s$

组别	VEGF/ng·L ⁻¹				PECAM-1/ng·L ⁻¹			
	D ₁₁	D ₁₈	D ₂₅	D ₃₂	D ₁₁	D ₁₈	D ₂₅	D ₃₂
正常对照组	954 ± 138	903 ± 118	960 ± 124	920 ± 125	5.15 ± 1.89	5.21 ± 1.77	5.28 ± 1.71	5.40 ± 1.59
模型对照组	919 ± 182	319 ± 131 ^a	387 ± 153 ^a	500 ± 122 ^a	5.26 ± 2.10	2.04 ± 0.79 ^a	2.96 ± 0.95 ^a	3.04 ± 0.71 ^a
阳性对照组	920 ± 129	444 ± 133	450 ± 156	768 ± 138 ^c	5.44 ± 2.51	2.43 ± 1.08	3.96 ± 1.23	17.70 ± 6.65 ^c
QGSX 低剂量组	1 134 ± 411	459 ± 136	431 ± 136	656 ± 133 ^b	5.19 ± 1.52	2.01 ± 0.50	3.45 ± 0.77	5.21 ± 1.36
QGSX 中剂量组	1 109 ± 251	476 ± 148 ^b	524 ± 126	753 ± 172 ^c	5.31 ± 1.7	3.05 ± 1.71	4.19 ± 1.15	6.84 ± 3.61
QGSX 高剂量组	901 ± 100	563 ± 183 ^c	571 ± 155 ^b	771 ± 153 ^c	4.84 ± 1.54	3.14 ± 0.89	4.90 ± 1.38 ^c	17.28 ± 4.68 ^c

与正常对照组比较 a: $P < 0.01$; 与模型对照组比较 b: $P < 0.05$ c: $P < 0.01$

如图 2 和表 4 所示,连续给药 10 d(D₁₁),各组小鼠 PECAM-1 无明显差异;造模结束后(D₁₈)、造模结束后连续给药 d 7 和 d 14(D₂₅和 D₃₂),模型对照

组小鼠 PECAM-1 含量和蛋白表达显著减少,强骨生血口服液高剂量组小鼠 PECAM-1 含量和蛋白表达均显著减少。

讨 论

骨髓抑制主要临床表现为外周血细胞(白细胞、血小板、红细胞等)显著减少,骨髓微环境的改变及骨髓中血细胞前体活性显著降低等,是癌症的放、化疗及艾滋病高效抗病毒治疗的主要不良反应,并严重影响这类疾病的治疗效果。强骨生血口服液以骨液为君,有补肾益髓的功效,使骨髓充足,遂而骨质坚硬并且精气旺盛,精气旺盛则从中医角度来说便能转化为气血,骨液富含钙质等其他营养成分,对老人、儿童及妇女孕、乳期缺钙、贫血者,既能补足气血,又能防止进一步的损耗。以党参、黄芪为臣,具有补脾胃益气的功效,既可治精神不振,疲乏无力,又能促进贫血的自我恢复。而党参、黄芪与骨液相配,可使脾肾双补,使骨髓与气血之间相互转换,具有气血双补的功效。血有形,气无形,有形之血当以气生,因此以灵芝、大枣为臣,加强补气的作用以生血。黑木耳甘平无毒,协调诸药为使。因此本方各药相互协调,具有调理脾胃、滋补骨髓、益髓壮骨,增强机体造血功能及脾骨运化的功能。增强红细胞携带氧气的能力,使贫血得以治疗及改善。一般情况下,采用环磷酰胺模拟化疗后骨髓抑制模型,在造模期间可观察到明显的骨髓抑制现象,但随着停止给予环磷酰胺,对骨髓的抑制作用降低,白细胞在短时间内开始恢复。此方法简单易行,主要对白细胞的抑制作用明显,红细胞降低不明显,且持续时间较短^[5]。联合采用乙酰苯肼结合环磷酰胺,可同时明显降低红细胞和白细胞,因为乙酰苯肼对红细胞具有慢性氧化作用,使红细胞发生氧化损伤,导致红细胞膜溶解直至破裂,最终造成血液中红细胞数量减少。而且,采用此方法造模,动物存活率较高,血象抑制状态持续时间相对较长^[6]。因此,本次试验采用 APH-CP 联合诱导 BALB/c 小鼠形成复合型骨髓抑制模型进行研究。

为了观察强骨生血口服液对正常动物的影响,在造模前连续给药 10 d,发现强骨生血口服液能显著增加正常动物外周血 RBC 和 HGB,对 WBC 无明显影响。在 APH-CP 联合诱导骨髓抑制后,强骨生血口服液不仅能显著改善外周循环 WBC, RBC 和 HGB 的减少,同时显著增加骨髓有核细胞数的增加。细胞周期检测结果显示,APH-CP 联合处理小鼠后 1 d,骨髓细胞多停滞于 G_0/G_1 期,而强骨生血口服液能显著增加骨髓细胞 G_2/M 期细胞数及 $G_2/$

M 期细胞比例。强骨生血口服液中含有党参、黄芪、灵芝、大枣、黑木耳均具有补血,治疗血虚的功效。结合本次试验的结果,提示强骨生血口服液能显著改善 APH-CP 联合诱导的小鼠外周血红细胞和白细胞的减少,其机制与促进骨髓细胞的有丝分裂,加速骨髓再生及恢复,增加骨髓有核细胞数有关。

骨髓微环境包括基质干细胞、细胞外基质及多种细胞因子,被称为造血干细胞的“土壤”,共同协调造血干细胞的生命活动,是骨髓抑制后再恢复、造血生成调控等的重要影响因素^[7]。骨髓微环境中的细胞因子包括多种黏附分子、趋化因子,其中 VEGF 和 PECAM-1 被认为是维持骨髓微环境关键细胞因子。在骨髓细胞包括粒系、红系,巨核细胞、祖细胞和基质细胞都表达 VEGF 和 PECAM-1,前者通过结合特异性受体 VEGFR,以自分泌和旁分泌调控造血过程,后者能通过促进祖细胞归巢等作用调节骨髓微环境^[8-11]。本实验结果显示,APH-CP 联合处理能导致小鼠骨髓组织 VEGF 和 PECAM-1 的含量与蛋白表达均降低。而强骨生血口服液能显著的改善 APH-CP 诱导的这 2 种细胞因子的降低,提示强骨生血口服液加速骨髓再生及恢复与增加 VEGF 和 PECAM-1 表达,改善骨髓微环境有关。强骨生血口服液和当归生血口服液均能显著提升正常动物外周血中的 HGB,但强骨生血口服液同时还能提升正常动物外周血中的 RBC。在用于治疗 APH-CP 诱导的骨髓抑制模型中,强骨生血口服液对 HGB,RET, EPO 和有核细胞数的提升作用也明显强于当归生血口服液。

综上所述,强骨生血口服液对 APH-CP 诱导的骨髓抑制具有显著治疗作用,且与同类市售对照药比,在治疗骨髓损伤的药效作用具有一定优势,且其作用机制可能与增加骨髓组织中细胞因子 VEGF 和 PECAM-1,改善骨髓微环境,加速骨髓再生及恢复有关。

[参 考 文 献]

- [1] JABBOUR E, GARCIA-MANERO G, CORNELISON AM, et al. The effect of decitabine dose modification and myelosuppression on response and survival in patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(2): 390-394.
- [2] LI P, SUN H, HUA Y, et al. Metabolomics study of hematopoietic function of Angelica sinensis on blood deficiency mice model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 166(3): 261-269.



- [3] 朱映黎,张建军,黄银峰,等. 白芍和赤芍对环磷酰胺致血虚小鼠的补血作用及对 IL-3、TNF- α 影响的比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 4(29): 1058-1060.
- [4] HUA Y, YAO W, JI P, *et al.* Integrated metabonomic-proteomic studies on blood enrichment effects of *Angelica sinensis* on a blood deficiency mice model [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 853-863.
- [5] 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.
- [6] LI F, TANG R, CHEN LB, *et al.* Effects of astragalus combined with angelica on bone marrow hematopoiesis suppression induced by cyclophosphamide in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(5): 598-609.
- [7] PARK M, PARK CJ, CHO YW, *et al.* Alterations in the bone marrow microenvironment may elicit defective hematopoiesis: a comparison of aplastic anemia, chronic myeloid leukemia, and normal bone marrow [J]. *Exp Hematol*, 2017, 45(9): 56-63.
- [8] O'DONNELL RK, FALCON B, HANSON J, *et al.* VEGF-A/VEGFR inhibition restores hematopoietic homeostasis in the bone marrow and attenuates tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(3): 517-524.
- [9] TAI YT, ACHARYA C, AN G, *et al.* A novel anti-a proliferation-inducing ligand hAPRIL. 01A monoclonal antibody targets multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15): 394.
- [10] TODESCHI MR, EL BACKLY R, CAPELLI C, *et al.* Transplanted umbilical cord mesenchymal stem cells modify the *in vivo* microenvironment enhancing angiogenesis and leading to bone regeneration [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(13): 1570-1581.
- [11] TUDISCO L, ORLANDI A, TARALLO V, *et al.* Hypoxia activates placental growth factor expression in lymphatic endothelial cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 32873-32883.

编辑: 赵文锐/接受日期: 2017-09-18