

复方活血汤对免疫诱导再生障碍性贫血小鼠骨髓微环境的作用研究*

舒砚君 孙汉英 刘文励 肖侃艳 何美冬

内容提要 目的:探讨临床上治疗再生障碍性贫血(再障)加用活血化瘀药物提高疗效的机制。方法:建立免疫介导的再障小鼠模型,胃饲 100% 复方活血汤注射液每次 0.2ml,每天 2 次,第 10 天观察骨髓组织学、体外成纤维细胞集落形成单位(CFU-F)、培养基质细胞层的粘附能力,骨髓氧分压(PO_2)。结果:复方活血汤组小鼠白细胞计数,骨髓有核细胞计数,骨髓造血组织容量、CFU-F 计数,均较再障组有明显升高($P < 0.01$);且基质细胞粘附功能、骨髓 PO_2 已恢复至正常。结论:复方活血汤可促进再障小鼠骨髓微环境的修复及供氧,从而促进骨髓造血。

关键词 再生障碍性贫血 活血化瘀中药 骨髓 微环境

Effects of Composite Blood-Activating Decoction on Bone Marrow Microenvironment in Mice of Immune-Induced Aplastic Anemia Shu Yanjun, Sun Hanying, Liu Wenli, et al *Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan (430030)*

Objective: To explore the mechanism of elevating efficacy for aplastic anemia (AA) by using blood-activating and stasis-eliminating drugs. **Methods:** Immune-induced aplastic anemia model was established. Each mouse was gastrogavaged by 0.2 ml 100% composite blood-activating decoction (CBAD) twice a day. On the 10th day, the bone marrow histology, CFU-F, adhesive function of the cultured stromal cell layer, bone marrow PO_2 were observed. **Results:** In CBAD group, the WBC count, bone marrow karyocytes, bone marrow hematopoietic tissue volume, CFU-F count were significantly higher than those in AA group ($P < 0.01$). Moreover, the adhesive function of stromal cells and bone marrow PO_2 recovered to normal level. **Conclusion:** The commonly used composite blood-activating decoction could promote the recovery and oxygen-supply of bone marrow microenvironment in AA mice, and improved the bone marrow hematopoiesis.

Key words aplastic anemia, blood-activating and stasis-eliminating Chinese herbal drugs, bone marrow, microenvironment

再生障碍性贫血(再障)的中医传统治疗强调补益脾肾,我们在长期临床治疗再障过程中采用扶正祛邪之治则,以“补肾、益气、活血、清解”四法联用,取得了较好的疗效^[1]。为了探讨在补益脾肾基础上加用活血化瘀中药能提高再障疗效的机制,我们观察了复方活血汤对免疫诱导再障小鼠骨髓微环境的影响,现报告如下。

材料与方

1 动物 近交系 BALB/c 小鼠,雌性,8~12 周

龄,17~20g,由湖北省医学科学院提供。DBA/2 小鼠,雌雄兼用,8~10 周龄,由中山医科大学动物中心提供。

2 药物及试剂 复方活血汤注射液由丹参、全当归、川芎、赤芍按 2:2:1:1 比例组成,水煎醇沉,过滤,配制成 100% 药液(即每毫升含生药 1g),分装灭菌(由我院药理研究室提供)。RPMI 1640 培养液,20% 小牛血清、青霉素、链霉素(均由 Gibco 公司提供),氢化可的松(Sigma 公司产品),淋巴细胞分离液(上海试剂二厂生产)。

3 主要仪器 倒置显微镜(Olympus 公司产品)。

4 动物造模及分组 BALB/c 小鼠 24 只,随机均分为 3 组。正常组:未作任何处理。再障组:参照姚

* 国家自然科学基金资助课题(No. 39470883)

同济医科大学附属同济医院(武汉 430030)

军报道方法⁽²⁾, BALB/c 小鼠经 6.0Gy ⁶⁰Co γ 射线全身照射, 4h 内经尾静脉输注 DBA/2 小鼠的胸腺、淋巴结混合细胞悬液 0.2ml, 细胞数 1×10^6 个/只, 制模后即胃饲生理盐水每只 0.2ml, 每天 2 次, 连续 9 天。复方活血汤组: BALB/c 小鼠按上方法制模后即胃饲复方活血汤注射液每只 0.2ml, 每天 2 次, 连续 9 天。

5 尺骨骨髓氧分压(PO_2)测定 按孙汉英等方法⁽³⁾, 制模后第 5 天, 每组随机取 5 只小鼠测尺骨 PO_2 , 测后小鼠继续饲养给药, 第 10 天再测定 PO_2 1 次。称体重后观察有关指标。

6 观察项目及检测方法

6.1 外周血白细胞计数。

6.2 骨髓有核细胞(MNC)计数 参照唐佩弦等方法⁽⁴⁾。

6.3 尺骨中段骨髓切片组织学观察 动物处死后, 立即取尺骨固定, 塑料包埋切片, Giemsa 染色, 采用浦权等方法⁽⁵⁾, 高倍镜下观察微血管情况、骨髓造血组织容量百分率。

6.4 成纤维细胞集落形成单位(CFU-F)的培养 按刘文励等方法⁽⁶⁾制备骨髓 MNC 培养体系, 取其 1ml

接种于 24 孔培养板中, 置 37℃ 含 5% CO_2 饱和湿度的 CO_2 培养箱内孵育, 每周半量换液 1 次, 第 14 天于倒置显微镜下计数, 由 40 个以上成纤维细胞组成的集落为 1 个 CFU-F⁽⁶⁾。

6.5 骨髓基质细胞层的粘附能力测定 将上述骨髓 CFU-F 继续培养, 第 28 天基质形成后, 按刘文励等报道方法⁽⁶⁾测定基质细胞粘附能力。

7 统计学方法 数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 t 检验。

结 果

1 复方活血汤对免疫诱导再障小鼠骨髓微环境及造血的影响 见表 1。再障组、复方活血汤组小鼠的体重、白细胞计数、骨髓有核细胞计数均显著低于正常组($P < 0.01$), 骨髓造血组织容量显著减低($P < 0.01$)。但复方活血汤组上述 4 项指标较再障组有明显改善($P < 0.01$), 且体外 CFU-F 计数较再障组显著增加($P < 0.01$), 基质细胞粘附正常骨髓造血细胞能力已近正常($P > 0.05$)。

2 复方活血汤对免疫诱导再障小鼠骨髓 PO_2 的

表 1 复方活血汤对免疫诱导再障小鼠骨髓微环境及造血的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	体重 (g)	白细胞 ($\times 10^9/L$)	骨髓 MNC 数 ($\times 10^6/T$ 根股骨)	尺骨骨髓造血组织容量 (%)	CFU-F (个)	基质细胞粘附正常骨髓 MNC 能力 (%)
正 常	8	17.3 $\pm$ 0.9	6.5 $\pm$ 0.8	12.8 $\pm$ 2.8	92.1 $\pm$ 1.8	87.6 $\pm$ 12.4	73.4 $\pm$ 3.4
再 障	7	11.5 $\pm$ 0.7 $^{\Delta}$	0.9 $\pm$ 0.7 $^{\Delta}$	2.2 $\pm$ 0.3 $^{\Delta}$	24.9 $\pm$ 9.6 $^{\Delta}$	12.5 $\pm$ 7.3 $^{\Delta}$	56.2 $\pm$ 9.8 $^{\Delta}$
复方活血汤	8	15.4 $\pm$ 1.1 $^{**\Delta}$	2.6 $\pm$ 0.5 $^{**\Delta}$	5.1 $\pm$ 1.9 $^{**\Delta}$	45.5 $\pm$ 16.9 $^{**\Delta}$	39.2 $\pm$ 19.3 $^{**\Delta}$	73.0 $\pm$ 4.1 *

注: 与再障组比较, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与正常组比较, $^{\Delta} P < 0.01$

影响 见表 2。制模后第 5 天, 再障组和复方活血汤组骨髓 PO_2 无显著性差异, 且均比正常组低($P < 0.01$); 第 10 天再障组 PO_2 显著下降, 复方活血汤组明显高于再障组($P < 0.01$), 且接近正常组($P > 0.05$)。

表 2 复方活血汤对免疫诱导再障小鼠尺骨骨髓 PO_2 的作用 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	PO_2 (kPa)	
		第 5 天	第 10 天
正 常	5	12.5 $\pm$ 0.7	12.4 $\pm$ 1.1
再 障	5	10.2 $\pm$ 0.4 $^{\Delta}$	4.3 $\pm$ 2.9 $^{\Delta}$
复方活血汤	5	11.0 $\pm$ 1.3 $^{\Delta}$	11.8 $\pm$ 3.8 *

注: 与再障组比较, $^* P < 0.01$; 与正常组比较, $^{\Delta} P < 0.01$

讨 论

再障组小鼠的体重、外周血白细胞计数、骨髓有核细胞计数、骨髓组织学等多项指标均低于复方活血汤组, 说明本方活血化瘀中药对免疫诱导的再障小鼠有

治疗效果。

再障小鼠骨髓微环境障碍, 其中微血管系统严重破坏、断裂、充血、渗出及出血等⁽⁷⁾, 另一方面, 其骨髓严重低氧血症, 骨髓 PO_2 仅 4.3kPa, 实验结果证实再障小鼠骨髓病理现象属微观上的“气滞血瘀证”, 施以养血、活血、行气、化瘀治则确有病理基础的。本方以当归、丹参补血为主, 辅之以活血; 赤芍、丹参兼有化瘀、止血之功; 川芎补血之中兼行气祛瘀, 为血中气药, 符合中医“气行则血行, 瘀血去则新血生”的理论。本实验制模后第 10 天, 再障组骨髓 PO_2 严重低下时, 复方活血汤治疗组已近正常。骨髓微环境供氧改善, 必然有利于骨髓基质细胞及其细胞外基质生长, 增强基质细胞粘附造血细胞的能力, 从而调节和促进造血细胞的增殖分化, 使造血组织容量增加。本实验结果与中医理论相吻合, 揭示了活血化瘀中药在骨髓造血微环境中的应用前景。

参 考 文 献

1. 何美冬, 周剑锋, 杨 炜, 等. 中药复方“再障 1 号”治疗再生障碍性贫血临床和实验研究. 内科急危重症杂志 1995; 1(2): 65—67.
2. 姚 军, 李树浓. 淋巴细胞与再生障碍性贫血的实验研究. 中华血液学杂志 1991; 12(5): 229—231.
3. 孙汉英, 刘文勋, 肖佩艳, 等. 急性放射损伤对小鼠骨髓氧分压的影响. 中华放射医学与防护杂志 1997; 17(4): 插页 14.
4. 唐佩弦, 杨天楹主编. 造血细胞培养技术. 第 1 版. 西安: 陕西

科学技术出版社, 1985: 58.

5. 浦 权, 李世俊, 杨梅如主编. 骨髓活检病理学. 第 1 版. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1993: 59—62.
6. 刘文勋, 黄 伟, 何美冬, 等. 复方活血汤对辐射损伤小鼠骨髓基质细胞粘附功能的影响. 中国中西医结合杂志 1997; 17(6): 354—355.
7. 舒砚君, 孙汉英, 董凌莉, 等. 川芎嗪对免疫介导再障小鼠骨髓细胞 CD₃₄ 抗原表达的影响. 中国中西医结合杂志 1998; 18(2): 107—108.

(收稿: 1997-12-01 修回: 1998-03-13)

慢肝口服液治疗慢性乙型肝炎 100 例

李润东

我院于 1994 年 1 月~1996 年 10 月期间, 应用慢肝口服液治疗慢性乙型肝炎, 疗效显著, 现报告如下。

临床资料 160 例均符合 1990 年上海病毒性肝炎学术会议修订的诊断方案[中华传染病杂志 1995; 13(4): 241—247]。分为两组, 治疗组 100 例, 男 78 例, 女 22 例; 年龄 12~64 岁, 平均 36.84 岁; 病程 1~12 年, 平均 2.84 年。对照组 60 例, 男 46 例, 女 14 例; 年龄 8~72 岁, 平均 38.26 岁; 病程 1~15 年, 平均 3.23 年。

治疗方法 治疗组 100 例给予慢肝口服液(由本院制剂室制备, 主要成分为赤芍 15g 丹参 15g 丹皮 10g 大黄 10g 茵陈 20g 虎杖 20g 甘草 10g, 批号 931108、940612、951124) 25ml, 每日 2~3 次。对照组给予护肝片(吉林省四平市松辽制药厂生产, 批号 931121、941106, 药物组成: 胆汁粉、五仁醇保肝粉等) 4 片, 每日 3 次, 齐墩果酸(南通第三制药厂, 批号 930626、941023) 40mg, 每日 3 次, 肝泰乐(江苏前进制药厂, 批号 930812、950126) 0.1g, 每日 3 次, 两组中消化道症状明显, 进食受影响者, 可暂时给予能量合剂静脉滴注, 均不使用抗病毒及其他免疫调节药物, 疗程为 3 个月, 观察临床疗效及肝功能变化。

结 果 疗效标准: 显效: 症状消失, 血清胆红素(SB)、谷丙转氨酶(ALT)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)降至正常, 白蛋白(A)与球蛋白(G)比值 ≥ 1.5 ; 好转: 症状好转, SB、ALT、 γ -GT 降至治疗前的 1/2 以下, 白蛋白

与球蛋白比值为 1~1.5; 无效: 症状及体征无变化, SB、ALT、 γ -GT 下降不明显或升高者, 白蛋白与球蛋白比值 < 1 。结果: 治疗组显效 61 例, 好转 31 例, 无效 8 例, 总有效率为 92.00%; 对照组显效 19 例, 好转 27 例, 无效 14 例, 总有效率为 76.67%; 治疗组优于对照组, 两组疗效比较有显著性差异($P < 0.01$)。两组治疗前后肝功能变化, 见附表。

讨 论 慢性乙型肝炎病程迁延, 病机复杂, 我们以清热凉血, 活血化瘀, 解毒利湿为主要药物组成的慢肝口服液治疗。方中赤芍、丹皮凉血活血, 改善肝脏血液循环, 增加肝脏血流量, 使肝脏缺血缺氧、瘀胆减轻。丹参活血化瘀、凉血养血, 是目前治疗慢性肝脏疾病的有效药物。近年来文献报道, 丹参能活跃肝脏微循环, 降低血液粘度, 改善肝脏营养, 促进肝细胞再生, 并且丹参中的有效成分丹参酮 II-A 磺酸钠有明显的抗脂质氧化作用, 能保护肝细胞膜和线粒体的完整性和通透性, 清除有细胞毒的氧自由基, 临床上对急慢性肝炎有较好的临床疗效。茵陈、虎杖可清热化湿、利胆退黄, 能促进胆汁的分泌及排泄。大黄泻下攻积、利湿退黄、清热解毒, 诸药合用, 既能清除慢性乙型肝炎之湿热毒邪, 又能疗其血瘀血热之患, 且本制剂价格低廉, 服用方便。经急、慢性毒理试验, 证实无明显毒性, 经临床应用疗效较好, 是治疗慢性肝炎的有效药物。

附表 两组患者治疗前后肝功能变化的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数		SB(μ mol/L)	ALT(u)	γ -GT(u)	A(g/L)	G(g/L)
治疗	100	治疗前	38.43 $\pm$ 9.70	163.23 $\pm$ 21.32	196.15 $\pm$ 27.11	36.57 $\pm$ 4.46	37.22 $\pm$ 6.72
		治疗后	15.78 $\pm$ 3.26**	33.25 $\pm$ 6.12**	43.72 $\pm$ 14.20*	41.11 $\pm$ 6.19**	26.44 $\pm$ 4.18*
对照	60	治疗前	41.21 $\pm$ 10.31	149.70 $\pm$ 23.22	201.36 $\pm$ 26.33	36.40 $\pm$ 2.27	38.81 $\pm$ 3.29
		治疗后	18.47 $\pm$ 5.61	36.66 $\pm$ 8.34	49.28 $\pm$ 15.11	38.21 $\pm$ 3.26	28.51 $\pm$ 6.73

注: 与对照组治疗后比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(收稿: 1997-01-22 修回: 1998-01-20)