

复方活血汤对再生障碍性贫血小鼠骨髓造血细胞粘附分子及细胞周期蛋白表达作用*

孙汉英 董凌莉 刘文励 陶德定 徐慧珍

内容提要 目的:探讨复方活血汤(简称中药)对免疫诱导的再生障碍性贫血(再障)小鼠骨髓造血细胞粘附分子及细胞周期蛋白表达的作用。方法:建立免疫诱导的再障小鼠模型,喂饲 100% 复方活血汤每次 0.2ml,每日 2 次,第 13 日用流式细胞仪检测小鼠骨髓单个核细胞 β_1 整合素家族(CD₄₉d/CD₂₉, $\alpha_4\beta_1$; 又称 Very Late Antigens, VLA 家族)及细胞周期蛋白 D₂ 的表达水平。结果:中药组 CD₄₉d 表达明显高于再障组 ($P < 0.05$),且与正常组无明显差异;中药组细胞周期蛋白 D₂ 表达明显高于再障组 ($P < 0.01$);而其 G₀ + G₁ 期细胞数显著低于再障组 ($P < 0.01$)。结论:复方活血汤能增强免疫再障小鼠骨髓造血细胞粘附分子 CD₄₉d 和细胞周期蛋白 D₂ 的表达,促进造血细胞的增生。

关键词 复方活血汤 再生障碍性贫血 骨髓造血细胞 粘附分子 细胞周期蛋白

Effect of Composite Blood-Activating Decoction on Expression of Adherent Molecule and Cyclin in Bone Marrow Hematopoietic Cells in Mice of Immune-Induced Aplastic Anemia Sun Hanying, Dong Lingli, Liu Wenli, et al *Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan (430030)*

Objective: To study the effect of composite blood-activating decoction (CBAD) on expression of adherent molecule CD₄₉d and cyclin D₂ in bone marrow hematopoietic cells in experimental immune-mediated aplastic anemia (AA) mice. **Methods:** After the model of AA was established, the animals were fed with 0.2ml of 100% CBAD, twice a day for 12 days. The CD₄₉d and cyclin D₂ expression level of bone marrow hematopoietic cells in model mice were measured by flow cytometer analysis system at the 13th day of experiment. **Results:** CD₄₉d expression level in CBAD group was significantly higher than that in the AA group ($P < 0.05$), and was similar to that in the normal group ($P > 0.05$). The expression of cyclin D₂ in CBAD group was significantly higher than that in the AA group ($P < 0.01$), but the cell count of G₀ + G₁ phase was significantly lower in the CBAD group, as compared with the AA group, $P < 0.01$. **Conclusion:** CBAD can increase the expression of adherent molecule CD₄₉d and cyclin D₂ in bone marrow hematopoietic cells, and promote the growth of hematopoietic cells.

Key words composite blood-activating decoction, aplastic anemia, bone marrow hematopoietic cells, adherent molecule, cyclin

骨髓造血干细胞的增殖、分化、释放是通过造血干细胞表面粘附分子与基质细胞、细胞外基质上的粘附蛋白配体结合而实现的。我们已证实常用活血化瘀中药丹参、当归、川芎、赤芍组成的复方制剂能增强受损骨髓基质细胞的粘附功能⁽¹⁾。本研究则从骨髓造血细胞方面观察复方活血汤对造血细胞表面粘附分子 β_1 整合素家族(CD₄₉d/CD₂₉, 又称 Very Late Antigens, VLA 家族)及细胞周期蛋白(cyclin)水平的影响,进一

步探讨常用活血化瘀中药如何在分子生物学水平上调节骨髓造血,报告如下。

材料与方法

1 动物 近交系 BALB/C 小鼠(H-2^d, ML^s^b), 雌性, 8~12 周龄, 体重 17~20g, 由湖北省医学科学院提供。DBA/2 小鼠(H-2^d, ML^s^a), 8 周龄, 雌雄兼用, 由中山医科大学实验动物中心提供。

2 药物和试剂 复方活血汤(简称中药)由丹参、全当归、川芎、赤芍按 2:2:1:1 比例称重, 水煎, 醇沉, 过滤, 配制成 100% 药物(即每毫升含生药 1g), 分装灭菌(由本院药理研究室提供)。大鼠抗小鼠 CD₄₉d

* 国家自然科学基金资助课题(No. 36970911)

同济医科大学附属同济医院(武汉 430030)

(VLA₄)单克隆抗体(phermingen 公司产品);羊抗大鼠免疫球蛋白异硫氰酸(FITC)绿色荧光 IgG 结合抗体(phermingen 公司产品);大鼠抗小鼠细胞周期蛋白 D₂(calbiochem 公司产品);碘化丙啶(PI, Sigma 公司产品), Rnase A(sigma 公司产品)。

3 仪器 流式细胞仪(Becton Dickinson Facsort)美国 BD 公司产品。

4 分组及处理 BALB/C 小鼠 18 只,随机分为 3 组,每组 6 只。正常组:未作任何处理。再障组:按姚军方法^[2]制备再障小鼠模型,即 BALB/C 小鼠⁶⁰Co-γ 射线 6.0Gy 全身照射,4h 内由尾静脉输注 DBA/2 小鼠胸腺、淋巴结混合细胞悬液 0.2ml(细胞数为每只 1×10^6 个);制模后即每只小鼠喂饲生理盐水 0.2ml,每日 2 次,连续 12 日。中药组 BALB/C 小鼠同上述方法制模后即每只小鼠喂饲中药 0.2ml,每日 2 次,连续 12 日。

5 骨髓单个核细胞(MNC)粘附分子 CD₄₉d 表达的检测 制模后第 13 日断颈处死小鼠,取股骨冲出骨髓细胞,制备骨髓 MNC 悬液,调细胞浓度为 1×10^7 /ml,按左连富介绍的方法^[3],依次用 1:10 稀释度的大鼠抗小鼠 CD₄₉d 单克隆抗体(第一抗体)和 1:40 稀释度的羊抗大鼠 IgG-FITC 荧光抗体(第二抗体)分别 4℃ 孵育 30min,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次后,经流式细胞仪检测 CD₄₉d 表达水平。测量时用抗体稀释液代替第一抗体的标本消除非特异性荧光。

6 骨髓 MNC 的细胞周期蛋白 D₂ 表达水平及其 G₀ + G₁ 期细胞比例的检测 将骨髓 MNC 用 1% 甲醛冰上固定 15min,洗涤后再用 80% 酒精 - 20℃ 固定。按文献^[4]介绍的方法,将固定的细胞清洗后用 0.25% Triton 8-100 PBS 液冰上作用 5min。清洗后依次加入 1:400 稀释度的大鼠抗小鼠细胞周期蛋白 D₂ 单克隆抗体(第一抗体)和 1:40 稀释度的羊抗大鼠 IgG-FITC 荧光抗体(第二抗体)分别 4℃ 过夜,室温 30min 孵育后,加入 10μg/ml PI 和 0.1% Rnase A PBS 染液作用 20min,经流式细胞仪分析骨髓 MNC 细胞周期蛋白 D₂ 表达水平及其处于 G₀ + G₁ 期的细胞比例。

7 统计学分析 采用 *t* 检验。

结 果

复方活血汤对再障小鼠骨髓单个核细胞 CD₄₉d、细胞周期蛋白 D₂、G₀ + G₁ 期细胞比例测定结果 见表 1。制备再障小鼠模型第 13 日,中药组骨髓 MNC 细胞 CD₄₉d 表达水平显著高于再障组($P < 0.05$),而与正常组之间无明显差异($P > 0.05$)。骨髓 MNC 细

表 1 3 组小鼠骨髓单个核细胞 CD₄₉d、细胞周期蛋白 D₂ 表达水平及 G₀ + G₁ 细胞测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CD ₄₉ d	细胞周期蛋白 D ₂	G ₀ + G ₁ 细胞(%)
正常	6	20.52 ± 1.36	1.20 ± 0.13	86.68 ± 1.11
再障	6	15.24 ± 1.99 [△]	3.69 ± 0.97 [△]	83.56 ± 0.78 [△]
中药	6	18.32 ± 2.39*	8.77 ± 1.12** [△]	81.11 ± 0.94** [△]

注:与再障组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与正常组比较,[△] $P < 0.01$;CD₄₉d、细胞周期蛋白 D₂ 数据单位为荧光道数

胞周期蛋白 D₂ 的表达中药组亦显著高于再障组($P < 0.01$),而其 G₀ + G₁ 期细胞数的比例则显著低于再障组($P < 0.01$)。

讨 论

细胞周期不同时相(G₁、S、G₂、M 期)间存在关键的监控点(checkpoint),其中重要的为 G₁/S 监控点。G₁/S 监控点受细胞周期蛋白基因表达和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)的磷酸化修饰的调控,决定细胞进入 S 期还是发生程序化死亡。当细胞周期蛋白积累超过一定的阈值,即与相应的 CDK 结合并使激活,进而作用于底物视网膜母细胞瘤(Rb)蛋白,使之磷酸化,从而使细胞越过 G₁/S 期监控点进入 S 期^[5]。已有学者证实细胞周期蛋白 D₂、细胞周期蛋白 D₃ 调节小鼠骨髓造血细胞 G₁ → S 期转换,且细胞周期蛋白 D 的表达水平影响着细胞由 G₁ → S 期转换的速率和时间^[6]。本研究显示复方活血汤组细胞周期蛋白 D₂ 表达显著高于再障组,细胞周期蛋白 D₂ 的高表达必加速细胞由 G₁ → S 期的转换,中药组处于 G₀ + G₁ 期细胞数的比例显著低于再障组,与之相符合也说明了这点。至于再障组细胞周期蛋白 D₂ 的表达也明显高于正常组的机理尚待进一步研究。

细胞粘附分子是位于细胞表面的糖蛋白。其中整合素 β₁ 亚家族中 VLA₄ 是髓系造血祖细胞的纤维粘连蛋白(Fn)的受体,表达于 90% 以上 CD₃₄⁺ 细胞上。早期造血祖细胞均通过 VLA₄ 粘附于基质细胞上的血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)及细胞外基质中 Fn^[7]。目前认为,细胞由 G₁ 期进入 S 期,首先需要细胞粘附到基质和细胞外基质,而这种粘附是受细胞周期蛋白 D₁ 和 A 的表达,细胞周期蛋白 - CDK₄ 的活化,细胞周期蛋白 E - CDK₂ 激酶的活化,视网膜母细胞瘤蛋白磷酸化的调节,细胞周期的这种依赖粘附的调节是由整合素家族介导的^[6]。本研究中复方活血汤能显著增加再障小鼠骨髓造血细胞粘附分子 CD₄₉d (即 VLA₄)的表达(CD₄₉d 实际是 VLA 家族 α₄β 中的 α₄ 亚家族的另一表达方式,测定 CD₄₉d 荧光值即代表

了 VLA₄ 的量)。在我们另一研究中,川芎嗪明显增加骨髓造血细胞 CD₃₄⁺表达^[8],说明活血化瘀中药,不仅作用于骨髓微环境基质细胞,提高其粘附功能,而且还作用于骨髓造血细胞,增强其表面粘附分子的表达,加强造血细胞与基质细胞间相互作用,也介导细胞周期及细胞周期蛋白-CDK 的调节,从而促进骨髓造血细胞增生。

参 考 文 献

1. 刘文勋,黄 伟,路 武,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.
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. 左连富.流式细胞术样品制备技术.北京:华夏出版社,1991:83,94—95.
4. Gong J, Bhatia V, Traganos F, et al. Expression of cyclin D₂

- and D₃ in individual normal mitogen stimulated lymphocytes and in MOUT-4 leukemic cells analyzed by multiparameter flow cytometry. Leukemia 1995;9:893—899.
5. Andok, Ajehebaum-cymbalista F. Regulation of G₁/S transition by cyclin D₂ and D₃ in hematopoietic cells. Proc, Natl Acad. Sci USA 1993;90:9571—9575.
 6. Radera G, Petrocelli T, Behrend E, et al. Overexpression of the integrin-Linked kinase promotes anchorageindependent cell cycle progression. J Biol Chem 1997;272(21):13937—13944.
 7. Jacobsen K, Kravitz J, Kincade PW. Adhesion receptors on bone marrow stromal cell: In vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and γ -irradiated mice. Blood 1996;87(1):73—82.
 8. 舒砚君,孙汉英,董凌莉,等.川芎嗪对免疫再障小鼠骨髓细胞 CD₃₄ 抗原表达的影响.中国中西医结合杂志 1998;18(2):87—89.

(收稿:1998-05-05 修回:1998-10-06)

中西药结合治疗念珠菌性阴道炎 158 例

赖艳萍

1995 年 7 月~1998 年 1 月,我们应用自拟白蛇洗剂及西药治疗念珠菌性阴道炎 158 例,并与用常规方法治疗的 156 例作对照,疗效满意,现报道如下。

临床资料 314 例均经实验室检查(白带)确诊为念珠菌性阴道炎患者,随机分为两组。中西药组 158 例,年龄 18~55 岁,平均 34.3 岁;病程 2~654 天,平均 18.34 天;未婚 10 例,已婚 148 例;外阴红肿、浅表破溃者 32 例,复发者 16 例。对照组 156 例,年龄 19~53 岁,平均 33.9 岁;病程 2~652 天,平均 17.76 天;未婚 10 例,已婚 146 例;外阴红肿、浅表破溃者 30 例,复发者 16 例。两组资料无显著性差异($P>0.05$)。

治疗方法 中西药组:(1)白蛇洗剂方药组成:白藓皮 30g 蛇床子 30g 苦参 25g 黄柏 20g 地肤子 20g 荆芥 15g 明矾 15g 鲜桉树叶 30g(如无桉树叶可用蒲公英 25g 代之),有明显外阴灼痛者加威灵仙 15g。(2)用法:上方加水 2200ml 煮沸 15min 后滤出药液,待温后用 400ml 药液分次灌至备用的冲洗器内冲洗阴道,然后将剩余药液坐浴 15~20min,再用制霉菌素 100 万 u 放置阴道深部,每天 1 次,15 天为 1 个疗程。每剂药可煎 2 次(用 2 天)。对外阴红肿、烧灼痛或浅表破溃者同时用氟氢松软膏加制霉菌素磨成粉混均涂外阴部,痛止停用。对照组用 2%~4% 温苏打水 400ml 分次灌至备好的冲洗器内冲洗阴道,再以 2%~4% 温苏打水 1800ml 坐浴 15~20min,再用制霉菌素 100 万 u 放置阴道深部,每天 1 次,15 天为 1 个疗程。对外阴红肿、烧灼痛或浅表破溃者处理同中西药组。两组经期停用,对以前有反复发作者均作系统治疗,即延长疗程 3~4

周,然后每次月经来潮前后各用药 7 天,连续用 3 个月。

结 果 (1)疗效标准:外阴瘙痒、灼痛及外阴、阴道充血水肿等消失,白带性状正常,停药 3 天后白带复查为阴性,隔天再查 1 次仍为阴性属近期治愈;以后每次月经来潮前数日复查 1 次,共 3 个月,均阴性者为治愈。停药 5 天后复查白带阳性者为无效。(2)疗效结果:中西药组 158 例,近期治愈 157 例(99.37%),无效 1 例;治愈 154 例(97.47%),复发 3 例。对照组 156 例,近期治愈 154 例(98.71%),无效 2 例;治愈 143 例(91.67%),复发 11 例。两组近期治愈率无显著性差异,治愈率有显著性差异($\chi^2=5.15, P<0.05$)。中西药组有 16 例慢性反复发作者以前未用过中药外洗,后经中西药系统治疗,均治愈。对照组 16 例慢性反复发作者以前亦未用过中药外洗,后仍用苏打水外洗系统治疗,治愈 13 例,无效 3 例。对两组复发及未愈者均按中西药再次治疗,均治愈。

体 会 中药外洗法是中医学很早就使用的传统而有效的治疗方法之一,对阴道炎更有独到之处,既可使药物直接作用于患处,同时又对患者起到清洗作用,减少诱发因素。本病属中医“阴痒”、“带下”的范畴。中医学认为其发生系脾虚生湿,湿热下注,湿蕴生虫;或外感不洁,邪毒内侵,虫蚀阴中而致。治疗以清热解毒,利湿收敛,杀虫止痒为其大法。白蛇洗剂以性味苦寒的白藓皮、蛇床子、苦参、黄柏、地肤子清热解毒、燥湿杀虫止痒;荆芥祛风解表,除湿止痒;明矾收敛,止痒并有抑菌作用;桉树叶疗湿疹、除疥癣、有杀菌消肿,抗感染作用;威灵仙除风湿,通经络,有镇痛抑菌作用。全方合用具有清热解毒,燥湿止带,杀菌止痒之功。用此方冲洗阴道及坐浴可增强阴道放置制霉菌素杀菌解毒之力,疗效甚佳,不易引起复发。

(收稿:1998-05-05 修回:1998-09-26)