

益肾生血片治疗再生障碍性贫血的实验研究

周霭祥 王天恩 杨经敏 麻 柔 杨 留 邓成珊 王 奎

庄杰盾 公殿广 刘 锋 许勇刚

内容提要 目的:探讨益肾生血片治疗再生障碍性贫血(再障)的作用机理。方法:观察了该药对小鼠造血功能、免疫功能、抗感染力和抵抗力的影响。结果:益肾生血片对马利兰引起的造血损伤小鼠多能造血干细胞(CFU-S)、粒系祖细胞(CFU-C)和红系祖细胞(CFU-E)的数量的恢复有明显促进作用;对正常小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能有明显促进作用;可明显降低接种金黄色葡萄球菌小鼠的死亡率;在常压缺氧时,可使小鼠耐缺氧能力明显提高,存活时间延长。结论:益肾生血片治疗再障有效可能是通过促进骨髓造血干细胞增殖,提高机体非特异性免疫力、抗感染力和抵抗力几方面作用来实现的。

关键词 益肾生血片 再生障碍性贫血 造血祖细胞 免疫功能 抗感染力

Experimental Study on Effect of Yishen Shengxue Tablet in Treating Aplastic Anemia Zhou Aixiang, Wang Tianen, Yang Jingmin, et al *Department of Hematology, Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100091)*

Objective: To study the mechanism of Yishen Shengxue Tablet (YSSXT) in treating aplastic anemia. **Methods:** Observing the effect of YSSXT on hematopoietic, immunologic, anti-infection and body resistance of model mice of aplastic anemia. **Results:** YSSXT had marked effect of promotion on recovering myleran injury induced reduction of colony forming unit-spleen (CFU-S), colony forming unit-culture (CFU-C), colony forming unit-erythrocyte (CFU-E), markedly promoting the peritoneal macrophage phagocytosis of normal mice, also markedly lower the mortality of Staphylococcus aureus inoculated mice, and elevate the anoxia resistant ability under normal pressure of anoxic mice, prolonging their survival time. **Conclusion:** Using YSSXT to treat aplastic anemia that the effectiveness might be realized through promoting the proliferation of hematopoietic stem cells of bone marrow, enhancing the non-specific immunity, and the anti-infection as well as body resistance.

Key words Yishen Shengxue tablet, aplastic anemia, hematopoietic stem cell, immunologic function, anti-infection ability

益肾生血片治疗再生障碍性贫血(再障)的临床研究取得令人满意的结果,总有效率 82.1%^{〔1〕}。为了探讨益肾生血片治疗再障的作用机理,我们观察了该药对小鼠造血功能、免疫功能、抗感染力和抵抗力的影响。现将结果报告如下。

材料和方法

1 材料

1.1 动物 LACA 雄性小鼠,8~10 周龄,17~20g;由军事医学科学院动物饲养场提供。

1.2 药物及试剂 (1)益肾生血片:由中国中医研究院西苑医院药厂提供,由熟地 200g 补骨脂 100g

黄芪 200g 当归 100g 旱莲草 100g 仙鹤草 200g 等中药组成,水煎后提取压片,批号:92081。每片 0.5g,含生药量 1.79g/片,蒸馏水溶成 40.25% 浓度待用。(2)马利兰,北京制药厂产品,2.0mg/片,用蒸馏水配成 0.05% 混悬液待用。(3)康力隆,广西南宁制药企业集团公司产品,2.0mg/片,用蒸馏水配成 0.05% 混悬液待用。(4)鸡红细胞悬液:取健康莱亨鸡翼下静脉血,按 1:4 的血量与 Aisevers 液混匀,置 4℃ 冰箱保存,用前以无菌生理盐水洗涤离心共 3 次,配制成 5% 鸡红细胞悬液。(5)金黄色葡萄球菌 ATCC25923,致病性大肠杆菌 ATCC25922,均由我院细菌室提供。

2 方法

2.1 动物造模及分组 小鼠再生障碍性贫血模型的建立:为模拟造血损伤,我们用马利兰连续口服给

药制成小鼠再生障碍性贫血模型,马利兰按照 $4\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃给药 45 天,75% 的给药小鼠外周血白细胞(WBC)、血小板(P)、血色素(Hb)较正常小鼠降低 1/3 以上,成为小鼠再生障碍性贫血模型。此时小鼠股骨内多能造血干细胞(CFU-S)数为正常对照组的 42.4% (马利兰组为 3237 ± 435 , 正常对照组为 7631 ± 482 , $P < 0.05$),并在停马利兰后第 6 天,马利兰组为 2178 ± 329 , 正常对照组为 7019 ± 513 , $P < 0.05$,表明马利兰可使造血干细胞受到损伤,数量明显减少,且恢复较慢,可用于观察药物对造血功能的影响。造模成功小鼠随机分为 4 组:模型对照组、阳性对照组、中药组 1、中药组 2;另以正常 LACA 小鼠作为正常对照组。

2.2 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠造血干细胞,造血祖细胞影响 方法参照文献⁽²⁾。用骨髓造血干细胞培养方法,观察益肾生血片对造血损伤小鼠股骨多能造血干细胞(CFU-S)、红系祖细胞(CFU-E)、粒系祖细胞(CFU-C)和成纤维细胞祖细胞(CFU-F)的影响。再生障碍性贫血模型小鼠随机分为 4 组;益肾生血片两个剂量组按 $8.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (中药组 1)、 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (中药组 2)不同浓度等体积灌胃,每天两次,灌胃 10 天,阳性对照组以康力隆($4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃 10 天,模型对照组以等体积生理盐水灌胃 10 天,同时用正常 LACA 小鼠 10 只以等体积生理盐水灌胃 10 天作为正常对照组。停药次日测定小鼠股骨内 CFU-S、CFU-C、CFU-E、CFU-F 数量。

2.2.1 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠 CFU-S 的影响 每组小鼠 3 只,每只取 1 根股骨 PMI-1640 培养液冲出骨髓细胞,过 4 号针头制成单细胞悬液,按每只 5×10^4 有核细胞 0.2ml,由尾静脉注入经 850rad γ 线照射的 LACA 受体小鼠,9 天后杀鼠取脾,固定于 Bouin's 液内,24h 计脾结节数,并由供体股骨有核细胞数,计算出股骨内 CFU-S 数。

2.2.2 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠粒系祖细胞 CFU-C 的影响 动物分组、给药及骨髓细胞悬液制备方法均同上,培养体系包括 RPMI-1640 培养液,20% 小牛血清,10% 条件培养液,有核细胞 10^5 种入 35mm 培养皿,每皿 1ml 培养体系,在 37°C , 5% CO_2 条件下培养 7 天后,低倍镜下按 50 个以上的细胞团为 1 个 CFU-C 进行计数。

2.2.3 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠红系祖细胞 CFU-E 的影响 动物分组、给药及骨髓细胞悬液制备方法均同上,配制培养体系后注入双面扩散盒,每个双面扩散盒容积 0.12ml,含 1×10^4 股骨有核细胞 RPMI-1640 培养液,小牛血清和适量小鼠枸

橐酸钠抗凝新鲜血浆,埋入受体小鼠腹腔,受体小鼠于埋盒前 48h,分别腹腔注射 50mg/kg 盐酸苯胍各 1 次,埋盒后 48h 取出扩散盒,将其内容物制成压片,经联苯胺-苏木精染色,低倍镜下以 8 个以上联苯胺染色阳性的有核红细胞团为 1 个 CFU-E 进行计数。

2.2.4 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠 CFU-F 的影响 动物分组、给药及骨髓细胞悬液制备方法均同上,配制培养体系后注入 35mm 培养皿内,培养液体积为 2ml,内含 2×10^5 股骨有核细胞, RPMI-1640 培养液,20% 的马血清,在 37°C , 5% CO_2 环境中培养 14 天,取出于低倍镜下按 50 个以上的细胞团为 1 个 CFU-F 进行计数。

2.3 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠外周血的影响 动物分组、给药方法均同上,停药次日尾静脉取血用血球自动分析仪测定。

2.4 益肾生血片对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 LACA 健康小鼠,体重 20~24g,雌雄兼用,来源同前;随机分为 3 组,益肾生血片两个剂量组按 $8.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (中药组 1)、 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (中药组 2)不同浓度等体积灌胃,每天两次,灌胃 10 天,10 只以等体积生理盐水灌胃 10 天作为正常对照组。实验方法参照张蕴芬等的方法⁽³⁾,按本实验条件略加改进,停药后第 2 天腹腔注射 5% 鸡红细胞悬液 0.5ml,处死后立即冲洗腹腔,并收集腹腔液的巨噬细胞,制片温育 30mm,固定后染色在油镜下观察,计数 200 个巨噬细胞,计算吞噬率及吞噬指数。

吞噬率(%) = 吞噬鸡红细胞巨噬细胞数/200 $\times$ 100%

吞噬指数 = 巨噬细胞吞噬的全部鸡红细胞数/200

2.5 益肾生血片对接种细菌小鼠抗感染作用的影响 LACA 健康小鼠,体重 20~24g,雌雄兼用,来源同前;随机分为 3 组,益肾生血片两个剂量组按 $8.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (中药组 1)、 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (中药组 2)不同浓度等体积灌胃,每天两次,灌胃 10 天,10 只以等体积生理盐水灌胃 10 天作为正常对照组。3 组小鼠停药后第 2 天腹腔接种不同数量细菌(金黄色葡萄球菌 ATCC25923,致病性大肠杆菌 ATCC25922),观察小鼠存活率。

2.6 益肾生血片对常压缺氧耐力的影响 LACA 健康小鼠,体重 20~24g,雌雄兼用,来源同前;随机分为 3 组,益肾生血片两个剂量组按 $8.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (中药组 1)、 $4.0\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (中药组 2)不同浓度等体积灌胃,每天两次,灌胃 10 天,10 只以等体积生理盐水灌胃 10 天作为正常对照组。3 组小鼠停药后

第 2 天将动物置于 250ml 的广口玻璃瓶中, 每瓶 1 只小鼠, 放 6g 石灰以吸收 CO_2 和水分, 用橡皮塞将瓶口塞紧后观察动物存活时间。实验重复 3 次。

2.7 统计学处理 采用 t 检验及 F 检验。

结 果

1 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠 CFU-S 的影响 见表 1。结果表明, 中药组 CFU-S 数/股骨较模型对照组明显增多, 说明在此种造血功能受到抑制的情况下, 益肾生血片对 CFU-S 数量回升有明显的促进作用。

2 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠 CFU-C 的影响 见表 1。结果表明, 马利兰可使 CFU-C 数量明显减少, 而益肾生血片对 CFU-C 数量的恢复有明显的促进作用。

3 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠 CFU-E 的影响 见表 1。结果表明, 马利兰可使 CFU-E 明显减少, 补肾生血片对 CFU-E 数量的恢复有明显的促进作用。

4 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠

CFU-F 的影响 见表 1。结果表明, 益肾生血片对 CFU-F 无明显影响。

5 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠外周血的影响 见表 2。结果表明, 补肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠外周血数量的恢复有明显的促进作用。

6 益肾生血片对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 见表 3。小剂量益肾生血片能明显提高正常 LACA 小鼠吞噬率及吞噬指数。

7 益肾生血片对小鼠抗感染作用 见表 4。实验结果表明: 小鼠腹腔注射 1×10^8 金黄色葡萄球菌时, 益肾生血片可以极为显著地降低小鼠死亡率, 但当接种菌量达每只 3×10^8 时, 益肾生血片对小鼠死亡率无明显影响, 益肾生血片对于接种致病性大肠杆菌小鼠死亡无明显影响。

8 益肾生血片对小鼠缺氧耐力影响 3 次实验结果均表明, 益肾生血片具有显著提高缺氧耐力的作用, 对照组小鼠平均存活 $(47.0 \pm 2.3) \text{min}$, 两个中药组小鼠平均存活 $(86.0 \pm 2.3) \text{min}$ 、 $(87.0 \pm 3.1) \text{min}$; 使小鼠的缺氧存活时间提高 80% 以上。

表 1 益肾生血片对小鼠 CFU-S、CFU-C、CFU-E、CFU-F 的影响 (个/股骨, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数或培养皿数	CFU-S	CFU-C	CFU-E	CFU-F
正常对照	10	7019 $\pm$ 513	23700 $\pm$ 2750	28920 $\pm$ 2470	1376 $\pm$ 4320
模型对照	10	2178 $\pm$ 329 *	9200 $\pm$ 1800 *	5370 $\pm$ 920 *	8540 $\pm$ 640 *
阳性对照	10	5423 $\pm$ 415 * Δ	18500 $\pm$ 3540 * Δ	23310 $\pm$ 1940 * Δ	8900 $\pm$ 740 *
中药 1	10	5145 $\pm$ 376 * Δ	17300 $\pm$ 3120 * Δ	20130 $\pm$ 1670 * Δ	8750 $\pm$ 670 *
中药 2	10	5042 $\pm$ 389 * Δ	15100 $\pm$ 2700 * Δ	19020 $\pm$ 1810 * Δ	9120 $\pm$ 740 *

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 益肾生血片对再生障碍性贫血模型小鼠外周血的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Hb(g/L)	RBC($\times 10^{12}/\text{L}$)	WBC($\times 10^9/\text{L}$)	Plt($\times 10^9/\text{L}$)
正常对照	10	132 $\pm$ 18	4.90 $\pm$ 0.24	11.60 $\pm$ 1.90	980 $\pm$ 98
模型对照	10	71 $\pm$ 14 *	2.55 $\pm$ 0.16 *	5.78 $\pm$ 0.76 *	320 $\pm$ 87 *
阳性对照	10	94 $\pm$ 18 * Δ	3.46 $\pm$ 0.18 * Δ	8.75 $\pm$ 0.83 * Δ	560 $\pm$ 98 * Δ
中药 1	10	91 $\pm$ 13 * Δ	3.23 $\pm$ 0.17 * Δ	8.46 $\pm$ 0.91 * Δ	570 $\pm$ 81 * Δ
中药 2	10	89 $\pm$ 15 * Δ	3.19 $\pm$ 0.18 * Δ	8.13 $\pm$ 0.89 * Δ	540 $\pm$ 79 * Δ

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 益肾生血片对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	吞噬率(%)	吞噬指数
正常对照	10	52.56 $\pm$ 2.15	1.27 $\pm$ 0.14
中药 1	10	88.00 $\pm$ 3.51 *	2.74 $\pm$ 0.27 *
中药 2	10	49.60 $\pm$ 3.13	1.07 $\pm$ 0.14

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

再生障碍性贫血属于中医的“虚劳”、“血虚”、“血证”等范畴, 中医认为其病机为脾肾虚, 益肾生血片补肾益髓, 治疗再生障碍性贫血的临床研究取得令人满意的结果, 总有效率 82.1%^{〔1〕}。为探讨其疗效机理, 我们观察了该药对马利兰造成的再生障碍性贫血模型小鼠造血干细胞、粒系、红系造血祖细胞的影响, 发现

表 4 益肾生血片对接种细菌小鼠存活率的影响

组别	鼠数	存活数(只)			
		金黄色葡萄球菌 (1×10^8 /只)	金黄色葡萄球菌 (2×10^8 /只)	金黄色葡萄球菌 (3×10^8 /只)	大肠杆菌 (3×10^8 /只)
正常对照	10	0	0	0	2
中药 1	10	9*	8*	1	3
中药 2	10	8*	9*	1	2

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$

益肾生血片对 CFU-S、CFU-C 和 CFU-E 的数量的恢复有明显促进作用。

我们以前的工作已证明:黄芪促进多能造血干细胞增殖,补肾中药促进粒、单系祖细胞的增殖,补脾和活血中药促进红系祖细胞的增殖⁽⁴⁾,这些结果互相印证,说明补脾肾中药确能促进造血。

益肾生血片明显促进正常小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能,明显降低接种金黄色葡萄球菌小鼠的死亡率,使小鼠耐缺氧能力明显提高,存活时间延长,说明该药能提高机体的非特异性免疫力,有利于患者抵抗感染和低血红蛋白时的缺氧状态。

以上四个药效学实验结果提示益肾生血片治疗再障可能是通过促进骨髓造血干细胞增殖,提高机体非

特异性免疫力、抗感染力和抵抗力几方面作用来实现的。

参 考 文 献

1. 周儒祥,王天恩,杨经敏,等. 益肾生血片为主治疗再生障碍性贫血的临床研究. 中国中西医结合杂志 1998;18(10): 603—606.
2. 吴祖泽主编. 造血干细胞移植基础. 北京:人民卫生出版社, 1988:4, 57, 86.
3. 张蕴芬,崔文英,李顺成,等. 观察巨噬细胞吞噬功能的滴片法. 北京医学院学报 1979;(2):114—117.
4. 周金黄,王建华主编. 中药药理与临床研究进展(第四册). 北京:军事医学科学出版社,1996:266—272.

(收稿:1998-06-26 修回:1998-11-11)

胃麻灵在口腔科拔牙中的应用

王光昌 刘德国

我们采用自制的胃麻灵外涂,用于拔除乳牙及松动恒牙,并与普鲁卡因注射麻醉做了对照观察,现报告于下。

临床资料 我们临床观察病例 120 例,将入选病例随机分为甲、乙两组,每组各 60 例,甲组为胃麻灵组,乙组为普鲁卡因组。甲组男 42 例,女 18 例;年龄 6~68 岁,平均 21 岁;因长恒牙而致乳牙松动者 28 例,恒牙畸形需拔除乳牙者 16 例,牙周病而致恒牙松动者 16 例。乙组男 38 例,女 22 例;年龄 8~64 岁,平均 28 岁;长恒牙而致乳牙松动者 22 例,乳牙致恒牙畸形者 18 例,牙周病致恒牙松动者 20 例。

方 法 胃麻灵组成:蟾酥 2g 草薢 6g 天南星 6g 甘草 4g,将上述药物研为粗粉,经 90% 酒精 500ml 浸泡 24h(或超声处理 30min),将其滤出液加入薄荷油(每 100ml 中加入 5ml)装瓶混匀备用。

麻醉时甲组以消毒干棉球将所拔牙齿及其周围牙龈擦干净,再以消毒棉球或棉签沾药液(每人用量约 1ml)在所拔牙齿及其周围涂擦 2~3 遍即可。乙组在所拔牙齿周围以 2% 碘酒消毒后,以注射器抽 2% 普鲁卡因(山东新华制药厂生产)2~

4ml 注射于所拔牙齿周围。用药后观察两组口腔粘膜出现麻木感的时间及持续时间。

结 果 甲组直接以棉球蘸药液在所拔牙齿及周围涂擦 2~3 遍即可。乙组需在所拔牙齿周围消毒,然后再注射普鲁卡因,用药前还应了解患者是否有普鲁卡因过敏史。两组均在用药后 3min 内出现麻醉效果,麻醉持续时间甲组平均 45min,乙组平均 30min。甲组术后重复用药有止痛、止血、抗炎作用,乙组术后用药仅有止痛作用。

讨 论 使用胃麻灵行口腔粘膜麻醉效果好,无毒副作用及过敏反应。胃麻灵中蟾酥含有蟾蜍灵、华蟾蜍它灵、华蟾蜍精等成分,具有强心、升压、抗炎、镇痛及抗过敏作用,其中蟾蜍灵局部麻醉作用最强,相当于地卡因 90 倍而无局部刺激作用。薄荷油含薄荷酮、薄荷醇等成分,有止血、止痛及抗过敏作用,局部应用使皮肤粘膜血管收缩,感觉神经麻醉而产生清凉、止痛、止痒作用。草薢有温中散寒、行气止痛功效,《本草纲目》中曾有用草薢液漱口治疗牙痛的记载。本组结果证实胃麻灵麻醉效果较好,似可代替普鲁卡因类药物麻醉,用于拔除乳牙及松动恒牙。

(收稿:1998-08-10 修回:1998-11-02)