

扶正抗白冲剂对微小残留白血病模型小鼠免疫功能及生存期的影响^{*}

许勇钢 麻 柔 胡乃平 刘 锋 杨经敏 马 玲 胡晓梅

内容提要 目的:研究扶正抗白冲剂(FZKBG)对实验小鼠免疫功能及生存期的影响,探讨 FZKBG 治疗微小残留白血病(MRL)的机理。方法:接种 L₇₂₁₂ 细胞 1×10^6 /只,接种后第 3 天腹腔注射环磷酰胺 250mg/kg,造成 MRL 模型小鼠,分成模型对照组、模型给药组,另设正常对照组、正常给药组,分别观察各组小鼠淋巴细胞亚群(CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺)改变,免疫器官病理变化和生存期。结果:与模型组比较,FZKBG 能明显提高正常小鼠和 MRL 模型小鼠 CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺ 的百分比和绝对值($P < 0.05$, $P < 0.01$)。且明显延长 MRL 模型小鼠存活期,延长生命率 29.6%~60.4%。结论:FZKBG 能明显延长 MRL 模型小鼠存活期,其机理可能是通过提高 MRL 模型小鼠的免疫功能,抑制体内白血病细胞而实现的。

关键词 扶正抗白冲剂 微小残留白血病 免疫功能

Effect of Fuzheng Kangbai Granule on Immune Function and Survival Time in Minimal Residual Leukemia Model in Mice XU Yong-gang, MA Rou, HU Nai-ping, et al *Xiyuan Hospital of China Academy of TCM, Beijing (100091)*

Objective: To observe the effects of Fuzheng Kangbai Granule (FZKBG) on immune function and survival time in minimal residual leukemia (MRL) model mice and study its mechanism. **Methods:** MRL model mice were established by hypodermic inoculation with L₇₂₁₂ cells following intraperitoneal injection of cytoxan (CTX) 25 mg/kg 3 days later, and divided into the control group and FZKBG group. The changes of T-lymphocyte subsets, including CD₃⁺、CD₄⁺ and CD₈⁺, and the survival time in model mice were observed. **Results:** Comparing with the control group, FZKBG could obviously increase both the percentage and absolute value of CD₃⁺ and CD₄⁺ lymphocytes and prolong the survival time of model mice, the prolongation rate being 29.6%–60.4%. **Conclusion:** FZKBG could markedly prolong the survival time of MRL mice, its mechanism might be through elevating the immune function and inhibiting the leukemic cells in model mice.

Key words Fuzheng Kangbai Granule, minimal residual leukemia, immune function

微小残留白血病(minimal residual leukemia, MRL)是白血病复发的根源,治疗 MRL 是预防白血病复发,延长白血病患者无病生存期的关键。中医认为:MRL 表现为“邪去正衰”、“气阴两虚”的特点⁽¹⁾。临床研究证明扶正抗白冲剂(FZKBG)能有效改善 MRL 患者免疫功能,提高 5 年持续完全缓解率⁽²⁾。本实验旨在研究 FZKBG 对 MRL 小鼠免疫功能及生存期的影响,为中医药治疗 MRL 提供实验依据。

材料和方法

1 材料

1.1 药品和试剂 FZKBG(由人参、黄芪、首乌、

女贞子、炒白术等中药组成,颗粒冲剂,每袋 12g,含生药 10.5g/袋,由本院药厂提供);大鼠抗小鼠单克隆抗体(anti-CD₃-fitc、anti-CD₄-fitc、anti-CD₈-fitc)购自美国 GIBCOL 公司。

1.2 动物 615 品系小鼠,体重 18~20g,雌雄各半,购自中国医学科学院实验动物中心。

1.3 仪器 流式细胞仪(美国 COULTER 公司 EPICS ELITE 型)。

1.4 L₇₂₁₂ 白血病细胞株 购自中国医学科学院血液病研究所。

2 方法

2.1 FZKBG 对 615 小鼠免疫功能的影响 615 小鼠雌雄各 40 只,随机分为 4 组,每组雌雄各 10 只,分别为正常对照组、正常给药组、模型对照组、模型给药组。模型对照组及模型给药组接种 L₇₂₁₂ 脾细胞 1

^{*} 国家中医药管理局重点资助课题(No. 922153);荣获中国中医研究院 1998 年度科技进步三等奖
中国中医研究院西苑医院(北京 100091)

$\times 10^6$ /只,接种后第 3 天腹腔注射环磷酰胺(CTX) 250mg/kg 体重,造成 MRL 小鼠模型⁽³⁾。第 4 天起正常给药组及模型给药组用 FZKBC(每袋加 10ml 蒸馏水,含生药 1.0g/ml,4℃ 保存备用)0.3ml 灌胃,2 次/天,相当于临床成人剂量的 10 倍;两个对照组用蒸馏水 0.3ml 灌胃,2 次/天。7 天后眼球取血后测定小鼠白细胞总数及白细胞分类,用单克隆抗体(McAb)孵育后上流式细胞仪测定小鼠 T 淋巴细胞亚群(CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+)。同时脱颈处死小鼠,取肝、脾、胸腺分别用扭力天平称重。

2.2 FZKBC 对 MRL 模型小鼠生存期的影响
615 小鼠雌或雄(每批实验用同一性别,共做 3 批实验)20 只,随机分为两组,每组各 10 只,造成 MRL 小鼠模型方法同前。第 4 天起按“2.1”方法、剂量给药至小鼠死亡为止。在投药期观察小鼠存活情况,每 12h 记录 1 次,定期观察小鼠体重、外周血象、死亡时体重、脏器重量等。共做 3 批实验。按下式计算生命延长率 $(T-C)/C \times 100\%$ (T:治疗组平均生存天数,C:对照组平均生存天数)。

结 果

1 FZKBC 对 615 小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响

表 1 FZKBC 对实验 615 小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD_3^+		CD_4^+		CD_8^+	
		百分比(%)	绝对值($\times 10^9/L$)	百分比(%)	绝对值($\times 10^9/L$)	百分比(%)	绝对值($\times 10^9/L$)
正常对照	20	47.9 $\pm$ 6.0	6.57 $\pm$ 0.82	36.3 $\pm$ 4.5	4.89 $\pm$ 0.62	23.1 $\pm$ 2.2	3.17 $\pm$ 0.30
模型对照	20	33.8 $\pm$ 9.1*	2.54 $\pm$ 0.99**	21.3 $\pm$ 6.7*	1.80 $\pm$ 0.94*	5.6 $\pm$ 2.7**	0.45 $\pm$ 0.30*
模型给药	20	45.6 $\pm$ 10.9 Δ	5.14 $\pm$ 1.66 $\Delta\Delta$	29.2 $\pm$ 4.3* Δ	3.23 $\pm$ 1.04* $\Delta\Delta$	6.6 $\pm$ 1.9**	0.72 $\pm$ 0.22 Δ **
正常给药	20	54.1 $\pm$ 6.6*	8.62 $\pm$ 0.98**	41.1 $\pm$ 4.3*	6.55 $\pm$ 0.69**	28.1 $\pm$ 3.6*	4.48 $\pm$ 0.57*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 FZKBC 对实验 615 小鼠脏器系数及白血病细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝脏系数	胸腺系数	脾脏系数	外周血白血病细胞	
					百分比(%)	绝对值($\times 10^9/L$)
正常对照	20	511.7 $\pm$ 31.3	16.00 $\pm$ 1.80	37.4 $\pm$ 3.3	0.0	0.0
模型对照	20	482.7 $\pm$ 46.3	3.73 $\pm$ 0.56**	16.6 $\pm$ 4.7**	23.1 $\pm$ 9.6	5.34 $\pm$ 2.42
模型给药	20	499.6 $\pm$ 38.9	3.54 $\pm$ 0.53**	15.1 $\pm$ 4.1**	13.1 $\pm$ 9.3 Δ	3.19 $\pm$ 3.15 Δ
正常给药	20	534.6 $\pm$ 32.3	21.40 $\pm$ 2.40*	41.1 $\pm$ 1.6*	0.0	0.0

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 FZKBC 对 MRL 小鼠存活期的影响

实验 批数	组别	n	生存天数			延长率(%)
			最短	最长	($\bar{x} \pm s$)	
1	模型对照	10	14.0	21.0	15.9 $\pm$ 2.3	29.6
	模型给药	10	13.5	57.0	20.6 $\pm$ 12.9	
2	模型对照	10	14.0	17.0	16.0 $\pm$ 1.7	56.9
	模型给药	10	14.0	60.0	25.1 $\pm$ 13.5	
3	模型对照	10	11.0	17.5	14.4 $\pm$ 1.8	60.4
	模型给药	10	13.5	73.5	23.1 $\pm$ 19.2	

影响 见表 1。FZKBC 可明显提高正常 615 小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 CD_3^+ 、 CD_4^+ 和 CD_8^+ 的绝对值和百分比;MRL 模型小鼠 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 的百分比和绝对值明显低于正常 615 小鼠,FZKBC 可明显提高 MRL 小鼠 CD_3^+ 、 CD_4^+ 的百分比和绝对值及 CD_8^+ 的绝对值。

2 FZKBC 对 615 小鼠脏器系数及外周血白血病细胞数量的影响 见表 2。FZKBC 可明显提高正常 615 小鼠脾脏系数和胸腺系数,而对肝脏系数无明显影响;MRL 小鼠各脏器系数明显低于正常 615 小鼠;FZKBC 可明显降低 MRL 小鼠外周血白血病细胞的百分比和绝对值,实验中发现外周血白血病细胞的百分比高者脾脏浸润也明显,反之外周血白血病细胞的百分比低者脾脏浸润不明显;与实验当中模型给药组胸腺系数和外周血白血病细胞的百分比和绝对值均较对照组低的结果相一致。但经统计学处理对 MRL 小鼠脏器系数无明显影响。

3 FZKBC 对 MRL 小鼠生存期的影响 见表 3。FZKBC 能明显延长 MRL 小鼠存活期,延长率为 29.6%~60.4%。模型对照组小鼠死亡时多有角弓反张、肢体扭曲现象,经脑脊液涂片发现有大量白血病细胞,而模型给药组小鼠死亡时角弓反张、肢体扭

讨 论

由于目前作为急性白血病(AL)的主要治疗方法的化疗祛邪的同时也伤正,AL 经化疗达到完全缓解(CR)后进入 MRL 阶段亦以正虚为主,表现为邪去正衰、气阴两虚的特点⁽¹⁾。现代医学研究发现 AL 患者免疫功能低下,包括 CD_3^+ (总 T)细胞下降, CD_4^+ (辅助性 T)细胞下降, CD_8^+ (抑制性 T)细胞升高, $CD_4^+ /$

CD₈⁺ 比值下降, LAK 细胞活性降低等。AL 患者完全缓解后处于 MRL 阶段, 免疫功能虽较完全缓解前有所恢复, 但较正常人低下⁽⁴⁾, 表明 MRL 患者免疫功能仍有缺陷。

FZKBG 是针对 MRL 免疫功能低下, 以黄芪、首乌等益气养阴多种中药组成的补益方剂, 临床研究证实 FZKBG 通过扶正培本, 可重建及恢复 MRL 患者免疫功能, 明显延长患者长期存活率⁽²⁾。

文献报道接种白血病细胞小鼠免疫功能也是降低的⁽⁵⁾, 本研究也证实 MRL 小鼠模型免疫功能低下。

以往研究^(6,7)认为: 黄芪等扶正中药近期能增强放化疗的敏感性, 长期可提高机体免疫功能, 提高巨噬细胞吞噬活性, 提高 CD₄⁺ 细胞比例, 增强 NK 细胞活性。本研究表明 FZKBG 可明显提高正常 615 小鼠和 MRL 小鼠 T 淋巴细胞及其亚群; 可明显提高 615 小鼠脾脏系数、胸腺系数, 提示 FZKBG 对实验动物体液免疫和细胞免疫功能有明显促进作用。对 MRL 小鼠脏器系数无明显影响的原因可能是由于模型制作过程中注射大剂量 CTX, 而 CTX 可引起免疫器官的明显萎缩, 并在短期内不易恢复, 而 FZKBG 仅给药 7 天, 无足够时间使其恢复; 此外 FZKBG 可明显降低 MRL 小鼠外周血白血病细胞的百分比和绝对值; 实验中发现: 外周血白血病细胞的百分比高者脾脏浸润也明显, 与实验结果给药组脾脏系数、胸腺系数和外周血白血病细胞的百分比和绝对值较对照组低相一致。

与临床研究结果⁽²⁾一致, FZKBG 能明显延长微小残留白血病模型小鼠存活期。现代医学证明, 骨髓移

植与化疗相比, AL 复发率低的主要原因不完全在于 BMT 前的放疗或化疗杀灭白血病细胞, 而是由于免疫介导的移植物抗白血病作用所致⁽⁸⁾, 尤其对成人急性非淋巴细胞白血病。扶正培本, 调整及提高机体免疫力正是中医之特长。本研究结果表明扶正抗白冲剂能改善和促进 MRL 模型小鼠的免疫功能, 延长白血病小鼠的存活期。

参 考 文 献

1. 麻柔, 刘锋, 薛向军. 中医对微小残留白血病的认识和治疗. 中医杂志 1994; 35(12): 748—750.
2. 麻柔, 刘锋, 杨经敏, 等. 扶正抗白冲剂对急性白血病患者长期存活影响的临床研究. 中国中西医结合杂志 1998; 18(5): 276—278.
3. 储建新, 王敏, 杨天楹, 等. 微小残留白血病的实验研究. 中华血液学杂志 1991; 12(8): 394—397.
4. Gale RP, Ben R. Autotransplants in leukemia: current state, future progress. Leukemia Res 1991; 15(9): 781—786.
5. 滕颖. 中药对移植性小鼠淋巴细胞白血病的影响. 上海中医药杂志 1992(3): 47—48.
6. 张代钊. 中药对肿瘤放化疗增效减毒作用. 中国中西医结合杂志 1992; 12(3): 135.
7. 骆和生, 罗鼎辉. 免疫中药学——中药免疫药理与临床. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 40—48.
8. Gale RP, Bulturini T. Is transplantation in first remission AML more effective than in advanced leukemia? Leukemia Res 1989; 13(12): 1035—1039.

(收稿 2000-02-02 修回 2000-11-02)