

三七总皂甙对免疫介导性再生障碍性贫血小鼠造血祖细胞的增殖作用*

盖云[△] 高瑞兰 牛泱平 金锦海 史亦谦

摘要 目的 探讨三七总皂甙(PNS)对免疫介导性再生障碍性贫血(再障)小鼠模型血细胞生成的作用。方法 采用免疫介导法进行再障造模, Balb/c 小鼠经⁶⁰Co γ 射线亚致死量照射后, 自尾静脉输入 DBA/2 小鼠的淋巴细胞, 随机分成 4 组, 即模型组、PNS 治疗高、中和低剂量组(每只 3.2、1.6、0.8mg/d), 并设正常对照组。腹腔注射给药, 模型组和正常对照组注射生理盐水。治疗 12 天后, 做血白细胞计数、骨髓病理检查和粒系、红系造血祖细胞(CFU-GM、CFU-E)集落培养。结果 (1) PNS 升高白细胞数, 与模型组比较, PNS 高、中和低剂量组的白细胞数提高率分别为(34.3 \pm 2.9)%、(29.2 \pm 1.7)%和(14.5 \pm 1.6)%($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。 (2) 改善骨髓抑制, 骨髓病理检查模型组出现大片空白区, 被大量的脂肪组织代替, 而 PNS 治疗组造血组织结构较完整, 造血细胞量丰富。 (3) 促进造血祖细胞增殖, 高、中和低剂量 PNS 对 CFU-GM 集落提高率分别为(64.4 \pm 2.8)%、(67.3 \pm 2.4)%和(21.9 \pm 1.8)% (均 $P < 0.01$); CFU-E 集落的提高率分别为(31.9 \pm 3.6)%、(20.7 \pm 2.4)%和(12.8 \pm 2.6)% ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 免疫介导性再障小鼠在骨髓抑制、造血功能低下时, PNS 通过促进骨髓粒系、红系造血祖细胞的增殖, 改善骨髓造血组织增生, 从而促进血细胞的生成。

关键词 三七总皂甙 再生障碍性贫血动物模型 造血祖细胞 增殖

Effect of Panax Notoginsenosides on the Proliferation of Hematopoietic Progenitor Cells in Mice with Immune-mediated Aplastic Anemia GAI Yun, GAO Rui-lan, NIU Yang-ping, et al *Affiliated Hospital of Zhejiang TCM College, Hangzhou (310006)*

Objective : To study the effect of panax notoginsenosides (PNS) on the proliferation of hematopoietic progenitor cells (HPC) in mice with immune-mediated aplastic anemia. **Methods** : Balb/c mice model of immune-mediated aplastic anemia was established by radiation with sublethal dose of ⁶⁰Co following the intravenously infusing lymphocytes of DBA/2 mice. Model mice in the treated groups were treated separately with high, middle and low dose of PNS, 3.2mg, 1.6 mg and 0.8 mg per day respectively by intraperitoneal injection. Model mice in the control group and normal mice in the normal control group were treated with normal saline. The peripheral white blood cell (WBC) count and pathological examination of bone marrow were carried out 12 days later, the bone marrow was taken to be incubated in semi-solid culture system for observing proliferation of HPC. **Results** : PNS could (1) increase peripheral WBC count : as compared with that in the model control, WBC in the high, middle and low dose PNS groups was raised by (34.3 \pm 2.9)%, (29.2 \pm 1.7)% and (14.5 \pm 1.6)% respectively, $P < 0.01$ and $P < 0.05$; (2) improve the bone marrow inhibition : pathological examination showed in the model group, the hematopoietic structure was destroyed and replaced by fatty tissue, while in the PNS treated groups, the structure of marrow was rather complete and filled with abundant hematopoietic cells; (3) promote the proliferation of HPC : as compared with the model group, the colony formation of CFU-GM were increased by (64.4 \pm 2.8)%, (67.3 \pm 2.4)% and (21.9 \pm 1.8)% respectively and that of CFU-E increased by (31.9 \pm 3.6)%, (20.7 \pm 2.4)% and (12.8 \pm 2.6)% respectively in the three PNS treated group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). **Conclusion** : PNS could enhance hematopoiesis by promoting proliferation of CFU-GM and

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30070933)

浙江中医学院附属医院(杭州 310006)

[△]现在上海市第九人民医院中医科(上海 200137)

通讯作者 盖云, Tel 021-58670561-283

CFU-E progenitors so as to improve the hematopoietic function in mice of immune-mediated aplastic anemia.

Key words panax notoginsenosides , animal model of aplastic anemia , hematopoietic progenitor cell , proliferation

三七总皂甙(panax notoginsenosides , PNS)是三七的主要有效成分 ,据报道具有提高机体细胞的耐缺氧能力 ,能改善微循环 ,减轻损伤 ,促进组织细胞的修复及再生等功能^[1]。但对再生障碍性贫血(aplastic anemia , AA)动物的实验研究尚未见报道。本研究采用免疫介导法建立 AA 动物模型 ,经腹腔注射给药 ,观察 PNS 对造血组织的修复和促进血细胞生成的作用 ,为三七的临床应用提供实验依据。

材料与方法

1 实验动物 Balb/c 小鼠(H-2^a ,m^{ls}^b) ,雌性 , 8~12 周龄 ,体重 17~22g ,用作 AA 模型载体。DBA/2 小鼠(H-2^a ,m^{ls}^d) ,雌性 ,10~12 周龄 ,体重 17~22g ,作为再生障碍性贫血模型免疫活性细胞供体(均由中国医学科学院上海实验动物中心提供)。

2 模型制备 参考中山医科大学姚军等的方法^[2]。先制备供体的胸腺和淋巴结细胞悬液 :取 DBA/2 小鼠 ,颈椎脱臼处死 ,无菌取出胸腺及颈部、颌下、腋窝、腹股沟、肠系膜等处的淋巴结。置于 200 目的不锈钢过滤网上 ,轻轻捣碎研磨 ,用生理盐水冲洗 ,收集单细胞悬液。计数后 ,台盼蓝拒染 ,活性细胞 > 95 % ,调整细胞浓度至 5 × 10⁹ /L。Balb/c 小鼠经⁶⁰Coγ 射线亚致死量(1.5Gy ,4min)全身均匀照射后 ,于 4h 内自尾静脉输入供鼠的淋巴细胞 10⁶ /只。

3 分组及处理方法 实验分为 5 组 ,每组 15 只。正常对照组和模型组给予生理盐水 ,PNS 治疗组给予高、中、低剂量的 PNS(陕西正康医药化工有限公司生产 ,每支 100mg/2ml) ,分别以每日 3.2mg、1.6mg、0.8mg/只 ,腹腔注射给药 ,连续 12 天。

4 外周血白细胞计数 小鼠摘眼球 ,各取等量血 ,肝素抗凝 ,调整浓度后 ,常规计数外周血白细胞数。

5 造血祖细胞培养 取各组小鼠股骨 ,用 RPMI 1640 液冲洗出骨髓单个核细胞 ,吹打并经过 5 号针头 ,1 000r/min 离心 10min ,洗涤两次 ,制成单细胞悬液(BMMNC)。CFU-GM、CFU-E 半固体集落培养按照本室已建立的方法^[3,4]。CFU-GM 培养体系含 30% 的马血清、重组人粒细胞集落刺激因子(rHu G-CSF) 10μg/L 和 0.3% 琼脂的 IMDM 培养基。CFU-E 培养体系加 35% 的马血清、重组的人红细胞生成素(rHu EPO) 2 000U/L 及 5% PHA-LCM 和 10⁻⁵ mol/L 的

IMDM。上述体系混匀后 ,接种至 24 孔培养板上 , 0.5ml/孔 ,4 个复孔 ,均含 10⁵ 个单个核细胞 ,置 37℃ , 5% CO₂ 的培养箱中孵育 5 天 ,计数集落数 ,CFU-GM 集落大于 50 个细胞 ,CFU-E 集落大于 8 个细胞计数为 1 个集落。

6 病理切片和观察 取小鼠双侧股骨 ,快速放入苦味酸 - 多聚甲醛脱钙固定液中 ,固定脱钙 ,24h 后 ,用 0.1mol/L 的 PBS 充分漂洗后进行常规脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片。HE 染色后在显微镜下观察骨髓造血组织增生情况并摄像。

7 统计学处理方法 各组均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,各组间的差异用 SPSS 软件作方差分析或 *t* 检验。

结 果

1 免疫介导性再障小鼠模型的建立 Balb/c 小鼠经⁶⁰Coγ 射线亚致死量全身均匀照射 ,输入 DBA/2 小鼠的淋巴细胞后 ,均于 8~14 天之内出现贫血症状。正常组小鼠骨髓病理切片 ,造血细胞分布均匀 ,骨髓造血组织支架结构紧密 ,未见明显的脂肪组织(图 A)。模型组造血组织间浅染 ,出现大量空白区 ,被大量的脂肪组织代替 ,造血细胞量减少(图 B)。

2 PNS 刺激再障小鼠骨髓增生 各剂量组再障的骨髓抑制均有所改善 ,病理切片可见网状造血组织较为增生 ,分布较均匀 ,出现造血组织基本结构修复现象。其中高剂量组造血组织间结构比较紧密 ,空白区少 ,造血岛着色均匀 ;中、低剂量组造血岛之间的空白也较模型组为少(图 C、D、E)。

3 PNS 提高外周血白细胞数 见表 1。模型组白细胞计数明显低于正常组。而 PNS 高、中剂量治疗组的白细胞计数均明显高于模型组 ,3 个治疗组提高率分别为(34.3 ± 2.9)%、(29.2 ± 1.7)%和(14.5 ± 1.6)%。

表 1 PNS 对外周血白细胞的作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	WBC(× 10 ⁹ /L)
正常	15	8.47 ± 0.25 **
模型	15	4.13 ± 0.32
PNS 高剂量	15	5.41 ± 0.36 **
PNS 中剂量	15	5.32 ± 0.24 **
PNS 低剂量	15	4.43 ± 0.20 *

注 :与模型组比较 ,* *P* < 0.05 ,** *P* < 0.01

4 PNS 促进粒系祖细胞增殖 见表 2。模型组

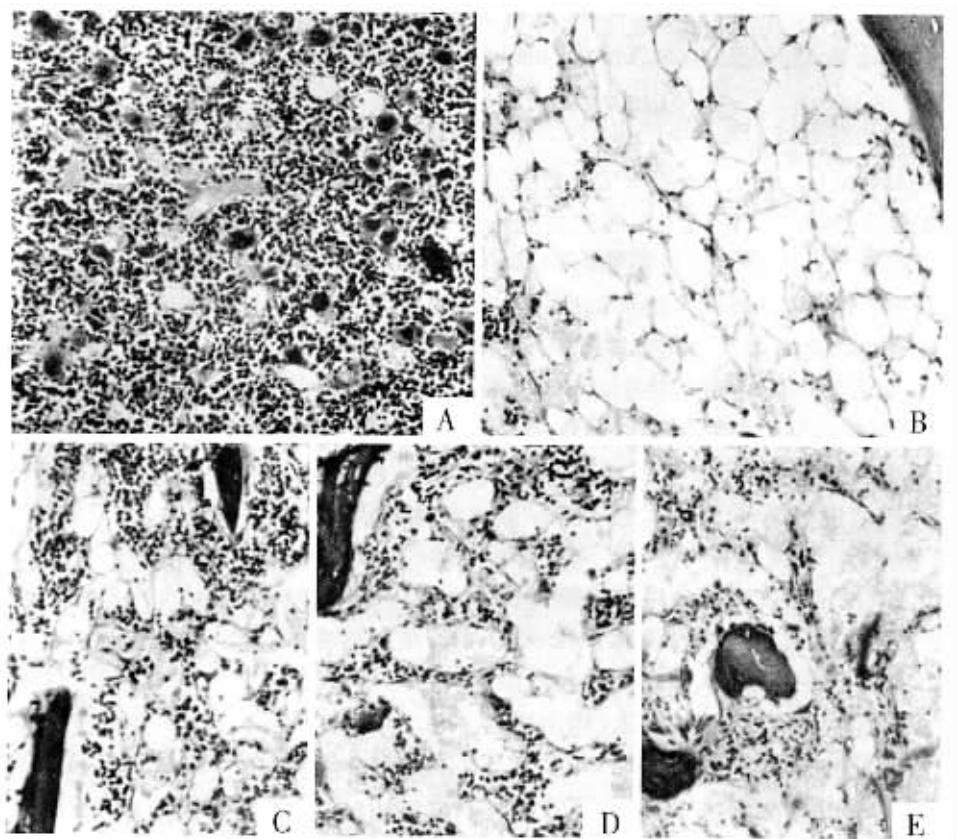


图 1 各组小鼠骨髓病理检查所见

A 正常组造血细胞分布均匀,造血组织支架结构紧密;B 模型组造血细胞减少,造血组织被大量的脂肪组织代替;C、D 分别为 PNS 高剂量组、PNS 中剂量组,造血组织出现网状增生较均匀,造血组织基本结构修复现象;E :PNS 低剂量组,造血细胞出现增生象,造血组织出现网状增生(HE×150)

的 CFU-GM 集落数明显低于正常组。而 PNS 高、中 和低剂量治疗组的 CFU-GM 数均明显高于模型组,提 高率分别为(64.4±2.8)%、(67.3±2.4)%和(21.9± 1.8)%。

表 2 PNS 对骨髓 CFU-GM 集落形成的影响 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CFU-GM	CFU-E
正常	10	50.7±4.6**	43.2±2.6**
模型	10	14.9±2.3	22.2±0.9
PNS 高剂量	10	27.3±2.9**	29.1±3.6**
PNS 中剂量	10	29.8±2.7**	29.7±3.5**
PNS 低剂量	10	18.2±2.1**	23.5±3.7*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

5 PNS 促进红系祖细胞增殖 见表 2。模型组 的 CFU-E 集落数明显低于正常组。而 PNS 高、中、低 剂量治疗组的 CFU-E 数均明显高于模型组,提高率分 别为(31.9±3.6)%、(20.7±2.4)%和(12.8± 2.6)%。

讨 论

血细胞按照发育阶段分为干细胞、祖细胞和成熟 细胞,所有血细胞均来源于造血干细胞。再障的发病

是由化学、物理、生物因素及不明原因所致的造血微环 境损伤、免疫功能异常,或造血干细胞受损引起的骨髓 造血功能衰竭,细胞生成减少或破坏过多,可分为特发 性和获得性两种^[5,6]。中医学将再障归于“血症”的范 畴,是外感六淫、内伤七情、邪毒等因素伤及脏腑,脏腑 功能受损,气血的化生和运行失调而发病。本研究利 用⁶⁰Co γ 射线照射后,输入异体小鼠的淋巴细胞建立 获得性免疫介导性再障动物模型,为研究中药对血细 胞生成的作用提供了有效的工具。

三七主要功能补气生血、理血化瘀。以前的研究 主要放在活血化瘀方面,而本研究探讨三七的生血作 用,用三七提取物 PNS 治疗免疫介导性再障小鼠,从 血象、骨髓病理和造血祖细胞培养三个层次来观察三 七对血细胞生成的作用。结果显示 PNS 能够显著地 升高白细胞,改善再障的骨髓抑制,及促进粒系、红系 造血祖细胞增殖。其他方面的作用据推测可能有改善 造血微循环^[7],免疫调节功能^[8],保护造血干细胞,促 进受损细胞恢复及刺激造血因子的分泌等,尚有待于 进一步研究。实验中低、中、高剂量的 PNS 分别相当

于生药三七 2g、4g、8g。结果中、高剂量,尤其中剂量组相对较好,相当于临床三七的常用量 3~6g,提示与临床用药基本一致。本研究为 PNS 的临床应用提供了一定的实验依据。

参 考 文 献

1 陈英.三七总皂苷的药理研究及临床应用进展.广西医学 1998 ;20(6):1109—1112.
2 姚军,李树浓.淋巴细胞与再障关系的实验研究.中华血液学杂志 1991 ;13(5):229—231.
3 高瑞兰,徐从连,金锦梅,等.人参总皂甙对正常人和再生障碍性贫血患者造血祖细胞的刺激增殖作用.中国中西医结合杂志 1992 ;12(5):285—287.
4 金锦梅,Tao Helen,高瑞兰,等.人参皂甙对 CD₃₄⁺干/祖细

胞的增殖和分化作用.中国中西医结合杂志 2000 ;20(9):673—676.
5 Jacobs P. Bone marrow failure :pathophysiology and management. Dis Mot 1995 ;41(4):201—289.
6 Nissen C, Wodnar-Filipowicz A, Slanicka Krieger MS, et al. Persistent growth impairment of bone marrow stroma after antilymphocyte globulin treatment for severe aplastic anemia and its association with relapse. Eur J Haematol 1995 ;55(4):255—261.
7 简道林,余金甫,黄海波,等.三七总皂甙对缺血—再灌注脑保护作用机制的研究.中国危重病急救医学 1999 ;11(3):145—147.
8 李淑慧,李晓辉,楚延.三七总皂苷抗炎作用机制的实验研究.中草药 2000 ;31(9):676—678.

(收稿 2002-06-28 修回 2002-10-20)

消肿化结散治疗预防接种致局部软组织红肿硬结 210 例

张 琪¹ 刘慎英² 王立芹²

笔者采用自制消肿化结散,局部外用湿热敷治疗接种百白破三联疫苗(DPT)后引起的局部软组织红肿硬结 210 例,疗效较好,现报告如下。

临床资料 1999 年 2 月—2002 年 9 月,收集 422 例预防接种 DPT 副反应局部红肿硬结的患儿,在征得家长同意及配合下进行免费治疗,将其随机分为治疗组和对照组。治疗组 210 例,男 99 例,女 111 例;年龄 3~5 个月 162 例,1.5 岁~2 岁 48 例。对照组 212 例,男 103 例,女 109 例,年龄 3~5 个月 165 例,1.5 岁~2 岁 47 例。两组患儿红肿硬结反应程度:治疗组弱反应 108 例,中反应 70 例,强反应 32 例;对照组弱反应 109 例,中反应 78 例,强反应 25 例。两组发病情况经统计学处理,差异无显著性($P>0.05$)。

诊断标准 本研究凡接种 DPT 后副反应出现注射部位局部软组织红肿硬结的患儿,根据红肿硬结直径的大小、天数将其分为弱反应、中反应、强反应。见表 1。

表 1 接种 DPT 后红肿硬结程度诊断标准

程度	红肿直径(cm)	硬结直径(cm)	天数
弱反应	0.5~2.5	1~1.5	>10
中反应	2.6~5.0	1.6~3.0	>20
强反应	>5.0	>3.0	>30

排除标准 (1)非接种 DPT 所出现的红肿硬结 (2)因接种吸附 DPT 所引起的无菌性脓肿 (3)周围皮肤损伤或出现各种疹类或痱子等。

治疗方法 消肿化结散处方组成及制作方法:桃仁 10g,红花 15g,浙贝母 15g,连翘 15g,金银花 15g,皂刺 15g,穿

山甲 10g。将以上中药碾磨成细粉,过 7 号筛($125\pm5.8\mu\text{m}$)装入纱布袋内(20 袋)。治疗组:取消肿化结散 1 袋放入盘中,取 30%乙醇媒剂 15ml 倒入盘中,将药袋均匀浸湿,贴于患处,上面再用热水袋加温(局部皮肤温度保持 $34\sim36^{\circ}\text{C}$),每次热敷 30min,早晚各 1 次,连敷 3 天。

对照组:用无菌毛巾放在 40°C 热水中浸泡湿透,取出拧干,直接放于患处(局部皮肤温度保持 $34\sim36^{\circ}\text{C}$),每次热敷 30min,早晚各 1 次,连敷 3 天。

结 果 (1)疗效判定标准:痊愈:红肿硬结完全消失;显效:红肿硬结缩小;无效:硬结无缩小,持续时间 16~23 天。(2)治疗结果:治疗组 210 例,痊愈 204 例(97.14%),显效 3 例(1.43%),无效 3 例(1.43%),总有效率为 98.57% ;对照组 212 例,痊愈 153 例(72.17%),显效 21 例(9.91%),无效 38 例(17.92%),总有效率 82.08% 。两组总有效率经统计学处理,差异有显著性($u=5.73,P<0.01$)。

讨 论 一般认为 DPT 异常反应的主要原因是百日咳全细胞内毒素含有各种致敏因子,可引起淋巴细胞增多症,对组织胺有原发致敏作用,故而引起注射部位局部红肿硬结。消肿化结散作用为活血祛瘀、消炎止痛、抗过敏。处方中的桃仁具有活血祛瘀、抗过敏作用;红花为诸种瘀阻之常用药,连翘寒能清热,透达表里,解疮毒;金银花为常用解毒药,具有抗菌、抗病毒作用,能增强免疫功能,对炎症早期能增强毛细血管通透性,对肿有明显的抑制作用;皂角刺托毒排脓,活血消痛,且能直达病所;穿山甲具有活血化瘀作用。在热敷治疗过程中,药袋垫隔在皮肤与热水袋之间,所以在使用上比较安全、方便,经临床验证效果好,见效快。

(收稿 2002-12-30 修回 2003-05-10)

1. 山东省枣庄市卫生防疫站(山东 277012);2. 山东省枣庄市立三院