

## · 基础研究 ·

## 乙酰苯肼致血虚证模型小鼠的证候物质基础初探

钱宏梁 潘志强 王晓敏 方肇勤

**摘要 目的** 研究乙酰苯肼引起的血虚证模型小鼠证候可能的物质基础。**方法** 以雄性 ICR 小鼠为对象,采用乙酰苯肼 170 mg/kg 皮下注射,第 1 天和第 4 天各 1 次制作血虚证模型,并设立正常对照组。动态观察小鼠体重变化,显微镜下观察血液细胞与股骨骨髓细胞,取肾脏、肾上腺和骨髓分别抽提 RNA,以实时荧光定量 PCR 技术检测相关基因表达、以 ELISA 方法检测血清皮质酮含量。**结果** 与正常对照组比较,乙酰苯肼小鼠造模 3 天后体重显著下降( $P < 0.05$ ),小鼠呈现虚弱征象,小鼠脾脏代偿性增大而胸腺却明显萎缩( $P < 0.01$ )。乙酰苯肼组小鼠血液红细胞形态异常、正常红细胞数量减少、白细胞代偿性增多;骨髓成熟的环状核细胞减少。与正常对照组比较,乙酰苯肼组小鼠骨髓 IL-5 和 IL-6 基因表达显著升高( $P < 0.05$ ),而巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、IL-1b 和 IL-7 基因表达显著下降( $P < 0.05$ );肾脏促红细胞生成素(Epo)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和 M-CSF 基因表达也显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),而粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)基因表达则被乙酰苯肼抑制( $P < 0.05$ );肾上腺 Cyp21a1 与 Cyp11b1 基因表达显著升高( $P < 0.05$ );小鼠血清皮质酮含量明显升高( $P < 0.01$ )。**结论** 乙酰苯肼所复制的证候以血虚证为主,脾脏肿大、肾脏 Epo 基因代偿性高表达以及继发肾上腺皮质功能虚性亢奋是该证候物质与功能变化最突出特征。

**关键词** 乙酰苯肼;血虚证;证候;促红细胞生成素;环状核细胞

Study of Material Base on Acetylphenylhydrazine Induced Blood Deficiency Syndrome Model Mice  
QIAN Hong-liang, PAN Zhi-qiang, WANG Xiao-min, and FANG Zhao-qin Basic Medical School,  
Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203)

**ABSTRACT Objective** To study the material base on acetylphenylhydrazine induced blood deficiency syndrome (BDS) model mice. **Methods** Male ICR mice were subcutaneously injected with acetylphenylhydrazine (170 mg/kg). BDS model was prepared on the 1<sup>st</sup> day and the 4<sup>th</sup> day. A normal control group was also set up by injecting normal saline at the same dosage. Body weight was dynamically observed. Changes of each organ were detected after sacrificed. Blood and femur bone marrow smears were made and observed under a microscope. RNAs were extracted from kidney, adrenal gland, and bone marrow using TRIzol kit. Related gene expressions were detected by real-time quantitative PCR, and serum corticosterone content was tested by ELISA. **Results** Compared with the normal control group, body weight of mice in the acetylphenylhydrazine group significantly decreased after 3 days modeling ( $P < 0.05$ ). The mice showed weak signs. Their spleens were compensatively enlarged, but the thymus was severely atrophic ( $P < 0.01$ ). Their erythrocytes' morphologies were abnormal and the numbers of normal red blood cells were reduced, and leucocyte were compensatively increased. Mature ring neutrophils in bone marrow were reduced. Compared with the normal control group, gene expressions of bone marrow IL-5 and IL-6 increased significantly ( $P < 0.05$ ), while gene expressions of M-CSF, IL-1b, and IL-7 decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Gene expressions of renal Epo, G-CSF, and M-CSF significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), but the gene expression of renal GM-CSF were inhibited by acetylphenylhydrazine ( $P < 0.05$ ). Gene expressions of adrenal gland Cyp21a1 and Cyp11b1 increased significantly ( $P < 0.05$ ). Moreo-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81473562)

作者单位: 上海中医药大学基础医学院(上海 201203)

通讯作者: 潘志强, Tel: 021-51322116, E-mail: pzzq527@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20181009.305

ver, serum corticosterone content increased obviously in the acetylphenylhydrazine group ( $P < 0.01$ ). Conclusions Acetylphenylhydrazine could cause typical BDS. The most prominent features included splenomegaly, compensatory high expression of renal Epo gene, and secondary adrenal hyperactivity.

KEYWORDS acetylphenylhydrazine; blood deficiency syndrome; syndrome; Epo; ring neutrophil

血虚证是中医临床常见的证候,尤其在多种慢性疾病及肿瘤放疗或化疗等术后多见。中医血虚证与现代医学的贫血并非完全一致,它包含两个层面意思,一是物质的减少,即表现为血液细胞或骨髓造血细胞数量减少与比例失衡,二是功能的失常,即中医学有关“血”功能的失调,比如心脾血虚所致心悸或不寐,心肝血虚所致的目干涩或眼昏花,脾不统血所致的出血现象等。中医补血的经典方剂有四物汤、当归补血汤、归脾丸等,揭示这些复方可能的药理机制需借助于血虚证动物模型,文献报道乙酰苯肼(acetylphenylhydrazine, APH)复制的证候模型非常类似于血虚证<sup>[1-3]</sup>。基于此,本研究采用了 APH 作了小鼠血虚证候模型,从外周血细胞、骨髓造血细胞、以及肾脏、肾上腺等层面深入探索该证候的可能物质基础,结果发现 APH 能引起小鼠典型的血虚外观、造血系统功能紊乱以及肾脏促红细胞生成素(Epo)高表达等特征,此可作为血虚证程度及中药干预后疗效评价的重要指标。

## 材料与方法

1 实验动物 ICR 小鼠, SPF 级, 雄性, 6~8 周龄, 体重 18~20 g, 32 只, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房。动物许可证号: SCXK(沪)2013-0016; 动物合格证编号: 2008001672748。实验伦理声明: 本设施的环境条件符合中国国家标准《实验动物环境及设施》(GB14925-2001)对普通动物实验设施的有关标准, 动物饲养管理和动物实验操作符合《实验动物管理条例》。

2 试剂与仪器 N-乙酰苯肼(国药集团化学试剂有限公司, 黄色结晶粉末, 货号: F20050927)。TRIzol 裂解液(Invitrogen 公司, 货号: 15596018), PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa 公司, 货号: RR036A), SYBR Premix Ex Taq (TliRNaseH Plus) II (TaKaRa 公司, 货号: RR820A); 上下游引物序列采用 Primer3 (v.0.4.0) 在线软件设计并委托 Life Technologies 公司合成(表 1)。小鼠皮质酮 ELISA 试剂盒(美国 Cayman 公司, 货号: 500655)。姬姆萨染液(Sigma-Aldrich 公司, 货号: BCBQ8217V)。实时荧

光定量 PCR 仪(Illumina 公司, Eco, 美国), Elx800 型酶标仪(Biotek 公司, Elx800, 美国), 台式离心机(Eppendorf 公司, 德国, 5417R 型), 显微镜(奥林巴斯, CX31 型, 日本), 单反数码相机(奥林巴斯, E330 型, 日本)等。

3 分组与造模 实验分 2 次进行, 每次各 16 只。小鼠适应性饲养 3 天, 当体重达 26~28 g 后, 随机分为 2 组, 正常对照组 6 只和 APH 组 10 只。第 1 天和第 4 天, APH 组予 170 mg/kg 剂量 APH, 皮下注射, 共 2 次; 正常对照组相同时间给予等量的生理盐水皮下注射。最后在第 5 天, 统一处死两组小鼠, 进行相关指标检测<sup>[1-4]</sup>。

4 小鼠外观表征信息采集 各组小鼠造模结束日即处死前日, 观察与收集以下指标: 整笼小鼠外观照片、单只小鼠外观照片、爪与唇部照片。

5 小鼠体重及脏器变化 实验过程中每日上午 10:00 称取小鼠体重。造模结束后, 处死各组小鼠称量脾脏质量以及胸腺质量计算脏器指数。方法如下: 脾脏指数 = 脾脏重量(mg)/体重(g), 胸腺指数 = 胸腺重量(mg)/体重(g)。

6 小鼠血液与骨髓涂片制作 造模结束后, 处死各组小鼠, 制作血液与骨髓涂片。方法如下, 取血液滴至载玻片一端, 用另一载玻片将血滴平整推开至血液铺展开为止。取小鼠股骨, 用牙签挑挤出骨髓, 并涂在滴有蛋白甘油的载玻片一端, 用另一载玻片将骨髓与蛋白甘油混匀液均匀涂散。涂片制作完成后 30 min 内, 采用姬姆萨染液分别染色血涂片 10 min、骨髓涂片 3 min, 流水冲洗, 待干燥后采用中性树胶封片, 并在 1 000 倍油镜下拍摄血液与骨髓照片。骨髓的环状核细胞占比计算方法: 在 1 000 倍油镜下拍摄骨髓涂片照片, 每只小鼠分别观察 5 个涂片视野, 每个视野计数 100 个骨髓细胞, 计算 500 个骨髓细胞的环状核细胞数百分比。

7 实时荧光定量 PCR 检测基因 mRNA 表达 造模结束后, 处死各组小鼠, 取肾脏组织检测  $\beta$  肌动蛋白( $\beta$ -actin)、Epo、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等基因 mRNA 表达; 取肾上腺组织检测  $\beta$ -actin、类固醇急性调节蛋白(Star)、

表 1 小鼠肾脏、肾上腺与骨髓有关基因引物序列

基因名称	基因库号	引物序列	产物长度 (bp)
$\beta$ -actin	NM_007393	上游 5' - TGTTACCAACTGGGACGACA - 3' 下游 5' - GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA - 3'	165
Cyp11a1	NM_019779	上游 5' - ACTTCCGGTACTTGGGCTTT - 3' 下游 5' - GCTTGAGAGGCTGGAAGTTG - 3'	201
Cyp11b1	NM_001033229	上游 5' - GTATCGAGAGCTGGCAGAGG - 3' 下游 5' - GGGTTGATGTCGTGTCAAGT - 3'	140
Cyp21a1	NM_009995	上游 5' - CTCCGGCTATGACATCCCTA - 3' 下游 5' - ACAGCCAAAGGATGGTGTTC - 3'	151
Epo	NM_007942	上游 5' - CCACCCCTGCTGCTTTTACTC - 3' 下游 5' - CTCA GTCTGGGACCTTCTGC - 3'	166
G-CSF	NM_009971	上游 5' - CTCAACTTTCTGCCAGAGG - 3' 下游 5' - TAGGTGGCACACA ACTGCTC - 3'	220
GM-CSF	NM_009969	上游 5' - ATGCCTGTCAAGTTGAATGA - 3' 下游 5' - CCGTAGACCCTGCTCGAATA - 3'	108
IL-1b	NM_008361	上游 5' - TGAAATGCCACCTTTTGACA - 3' 下游 5' - AGCTTCTCCACAGCCACAAT - 3'	192
IL-5	NM_010558	上游 5' - ATGGAGATTCCCATGAGCAC - 3' 下游 5' - CCCACGGACAGTTTGATTCT - 3'	180
IL-6	NM_001314054	上游 5' - CCGGAGAGGAGACTTCACAG - 3' 下游 5' - TCCACGATTTCCAGAGAAC - 3'	102
IL-7	NM_001313888	上游 5' - ATTGCCCGAATAATGAACCA - 3' 下游 5' - ACCAGTGTGTGTGCCTTG - 3'	172
M-CSF	NM_001113529	上游 5v - CTTCATGCCAGATTGCCTTT - 3' 下游 5' - ATGGAAAGTTCGGACACAGG - 3'	236
Star	NM_011485	上游 5' - TTGGGCATACTCAACAACCA - 3' 下游 5' - GAAACACCTTGCCACATCT - 3'	103

11 $\alpha$ -羟化酶 (Cyp11a1)、21 $\alpha$ -羟化酶 (Cyp21a1)、11 $\beta$ -羟化酶 (Cyp11b1) 等基因 mRNA 表达;取骨髓组织检测  $\beta$ -actin、G-CSF、M-CSF、白细胞介素家族分子 (IL-1b、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-7) 等基因 mRNA 表达。上述基因引物序列见表 1。方法如下:上下游引物序列采用 Primer3 (v. 0. 4. 0) 在线软件合成,委托 Life Technologies 公司上海合成部完成。按照 Trizol 试剂盒说明书抽提总 RNA;分别逆转录反应体系 10、10、40  $\mu$ L,反应条件为 37  $^{\circ}$ C  $\times$  15 min,85  $^{\circ}$ C  $\times$  5 s,4  $^{\circ}$ C;PCR 扩增反应体系为 20  $\mu$ L,反应程序为 95  $^{\circ}$ C  $\times$  3 min,95  $^{\circ}$ C  $\times$  30 s,60  $^{\circ}$ C  $\times$  30 s,40 个循环。基因相对表达量分析方法:采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析,以正常组作为对照组,以  $\beta$ -actin 基因 Ct 均值作为内参组, $\Delta Ct = Ct$  目的基因 - Ct 内参基因 (其中,Ct 值为扩增 n 个循环基因的荧光数值), $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  实验组 -  $\Delta Ct$  对照组,目的基因相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

8 ELISA 检测血清皮质酮含量 造模结束后处死各组小鼠,取血并分离血清,检测血液皮质酮含量。用血清原样本,依据小鼠皮质酮的 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

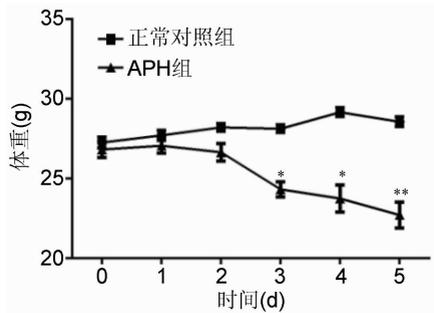
9 统计学方法 采用 GraphPad.Prism5. 0 专业软件进行作图、及统计分析,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验, $P < 0. 05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 两组小鼠外观表现 与正常对照组比较,APH 模型小鼠整体显虚弱状态、消瘦、活动度减弱、缺乏四处攀爬的好奇心、持续观察可见小鼠嗜扎堆,唇、爪、尾等部位苍白无血色 (类似临床失血外观像),毛色蓬松,小鼠肤温比正常小鼠明显下降,总体判断,APH 复制的模型小鼠呈现血虚为主的虚弱征象,或兼有气虚、阳虚证候特点。

2 两组小鼠体重动态变化及脏器指数变化 (图 1、2) 造模前 (0 d) 两组小鼠体重约 27 g,与正常对照组比较,APH 组造模第 3 天起至第 5 天小鼠体重快速下降 ( $P < 0. 05$ ,  $P < 0. 01$ );造模结束后,小鼠胸腺指数缩小 ( $P < 0. 01$ ),脾脏指数增大 ( $P < 0. 01$ )。

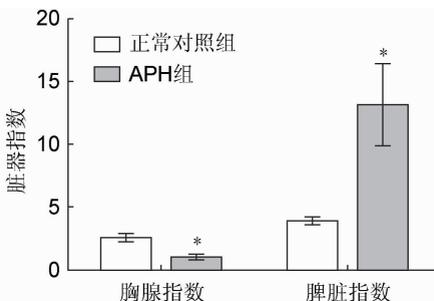
3 两组小鼠血液及骨髓像变化 (图 3) 正常对照组小鼠血液涂片有大量中央凹陷的典型球状红细胞,可见淋巴细胞等有核细胞散在分布 (图 3A);APH



注:与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\*

$P < 0.01$

图 1 两组小鼠体重动态变化



注:与正常对照组比较, \* $P < 0.01$

图 2 造模结束后两组小鼠胸腺与脾脏指数变化

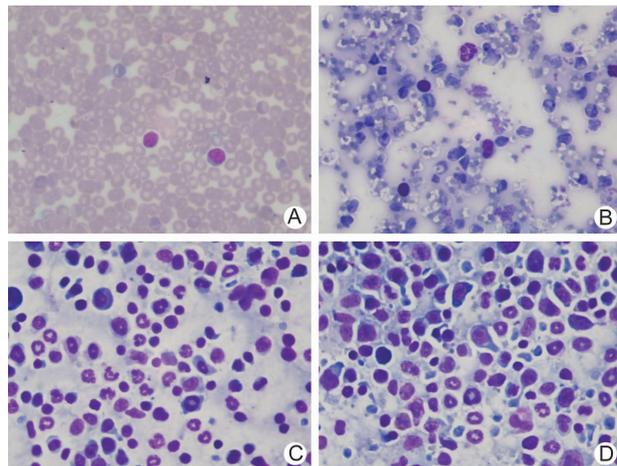
组小鼠红细胞明显破坏,或成碎片状、或细胞膜破裂,且白细胞数量显著增多,可见网织红细胞出现(图 3B)。正常对照组小鼠骨髓可见不同时期的红细胞、有核粒细胞、淋巴细胞、巨核细胞以及环状核细胞等。其中环状核细胞是骨髓分化与发育成熟的晚期有核细胞,与正常对照组(102/500)比较,APH 组小鼠环状核细胞(76/500)比例下降,相对而言早中期非成熟的细胞增多(图 3C,3D)。APH 造成小鼠血液红细胞形态异常、正常红细胞数量减少、白细胞代偿性增多;骨髓成熟的环状核细胞减少。

4 两组小鼠骨髓造血生长因子的基因表达变化(表 2) 与正常对照组比较,APH 组小鼠骨髓 IL-5 和 IL-6 基因表达显著升高( $P < 0.05$ ),而 M-CSF、IL-1b 和 IL-7 基因表达显著下降( $P < 0.05$ ),G-CSF 基因表达也上调,但是离散度大,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 两组小鼠骨髓基因表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	G - CSF	IL - 5	IL - 6	M - CSF	IL - 1b	IL - 7
正常对照	12	1.00 ± 0.81	1.00 ± 0.50	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.26
APH	20	38.79 ± 34.81	7.79 ± 4.30*	4.88 ± 1.38*	0.50 ± 0.18	0.29 ± 0.04*	0.28 ± 0.12*

注:与正常对照组比较, \* $P < 0.05$



注:A 为正常对照组血像;B 为 APH 组血像;C 为正常对照组骨髓像;D 为 APH 组骨髓像

图 3 两组小鼠血像和骨髓像 ( $\times 1000$ )

5 两组小鼠肾脏造血调控因子基因表达变化(表 3) 与正常对照组比较,APH 组肾脏 Epo、G-CSF 和 M-CSF 基因表达上调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),GM-CSF 基因表达下降( $P < 0.05$ )。

表 3 两组小鼠肾脏基因表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Epo	G - CSF	M - CSF	GM - CSF
正常对照	12	1.00 ± 0.32	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.36
APH	20	734.99 ± 288.73**	16.91 ± 4.68*	5.08 ± 2.18*	0.44 ± 0.40*

注:与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

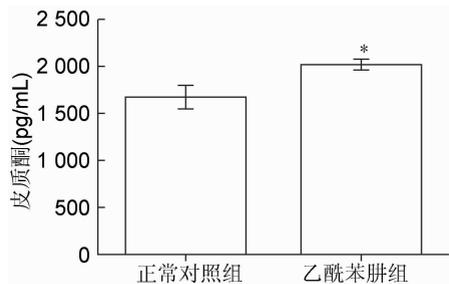
6 两组小鼠肾上腺类固醇激素合成酶基因表达变化(表 4) 与正常对照组比较,APH 组小鼠肾上腺 Cyp21a1 与 Cyp11b1 基因表达显著升高( $P < 0.05$ ),Star 和 Cyp11a1 基因表达轻度上调,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 4 两组小鼠肾上腺基因表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Star	Cyp11a1	Cyp21a1	Cyp11b1
正常对照	12	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.29
APH	20	1.35 ± 0.58	1.30 ± 0.48	1.95 ± 0.55*	2.25 ± 1.20*

注:与正常对照组比较, \* $P < 0.05$

7 两组小鼠血清皮质酮变化(图 4) 与正常对照组比较,APH 组小鼠血清皮质酮含量显著升高( $P < 0.01$ )。



注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$

图4 两组小鼠血清皮质酮含量变化

## 讨 论

血虚证是中医学临床的基本证候,临床常见面色淡白或萎黄、毛发无泽、唇色爪甲淡白、头晕、视物昏花、心悸、多梦失眠、健忘、乏力、手足发麻、妇女经量少色淡、经期错后或闭经、舌淡苔白、脉细等虚弱症候。实际上血虚证并非单纯出现,常伴随气虚证或阴虚证,中医学脏腑定位于心、脾、肝为主,涉及血脉、冲任、皮毛与肌肤腠理等。因此,实验动物模型难以集中复制临床血虚各种症状与体征,仅能对血虚证部分特征性变化予以模拟重现。目前,血虚证候动物模型造模方法较多,包括放血方法、溶血方法、化疗药物或放射线损伤造血系统方法等<sup>[4]</sup>。其中,APH 造模具有造模成功率高、模型稳定可信、周期短等优点,但是停止给予 APH 后模型具有自我恢复的缺陷,属于急性病理损伤模型。该血虚证产生的机制是 APH 作为典型的氧化还原作用药物,它被血红蛋白结合氧所氧化,生成正铁血红蛋白、过氧化氢及药物自由基,进而对红细胞进行性氧化性损伤<sup>[5,6]</sup>,以造成血液中红细胞数减少,同时伴随网织红细胞病理性代偿增加和白细胞数量代偿性升高。既往血虚模型的观察指标多以外观体征、红细胞数量、骨髓像以及部分生化指标为主,本研究重点观测了造模后小鼠血液细胞与骨髓细胞病理变化以及骨髓与肾脏造血系统有关分子变化,有助于综合评估 APH 血虚证的物质改变及其功能异常。

APH 能较专一地对红细胞造成缓慢性的进行性氧化性损伤。贲长恩等<sup>[1]</sup>发现采用 APH 皮下注射大鼠可以造成典型的中医血虚证。金若敏等<sup>[2]</sup>运用 APH 联合环磷酰胺制备血虚模型动物。卢文丽等<sup>[3]</sup>采用 170 mg/kg APH 对不同品系小鼠进行血虚证造模。钱宏梁等<sup>[4]</sup>研究认为 APH 法是目前最好的血虚证动物模型制备方法,其模型稳定性好且造模方法简单高效。本研究采用 170 mg/kg APH 进行血虚证造模。结果发现,从小鼠外观表现看,APH 能导致小鼠

黏膜苍白、消瘦、活跃度下降、身体与肢体凉等异常征象,从中医学理论分析其证候以血虚证为主,尚兼有气虚、阳虚等特点。结合脾脏肿大与胸腺萎缩体征,提示 APH 可影响小鼠免疫器官功能。此外,APH 所致小鼠血液红细胞形态异常、白细胞代偿性增多,且出现网织红细胞病理特征,与金若敏教授采用 APH 和环磷酰胺联合制作血虚证模型小鼠外周血红细胞、网织红细胞增多现象基本一致<sup>[2]</sup>,然而该报道发现白细胞减少,推测可能与环磷酰胺对白细胞的抑制作用有关。针对小鼠骨髓,本研究发现 APH 可引起小鼠骨髓环状核细胞比例下降,由于环状核细胞是小鼠与大鼠特有的成熟粒细胞,提示 APH 能阻滞骨髓成熟细胞的分化。同样,金若敏教授发现 APH 和环磷酰胺联合制作血虚证模型小鼠骨髓有核细胞数显著减少;电镜观察到骨髓细胞超微结构遭到破坏、细胞膜消失、线粒体肿胀、嵴断裂或消失、内质网、核糖体减少或消失、核染色质固缩、裂解等细胞变性、坏死与凋亡等现象<sup>[2]</sup>。

进一步检测调控造血生成有关基因表达变化,发现肾脏 Epo 基因表达升高幅度很大、且个体间离散度较大,由于 Epo 主要由肾球旁细胞合成与分泌,作用于骨髓造血系统,促进红系祖细胞的增殖、分化和成熟<sup>[7]</sup>,提示 APH 血虚证小鼠肾脏 Epo 基因代偿性表达增强以促进骨髓造血活跃,进而补充外周血红细胞数不足的病理状态。而肾脏粒细胞相关造血因子报道减少,本研究发现肾脏 G-CSF 和 M-CSF 基因表达显著上调,GM-CSF 基因表达却被抑制,提示 APH 可引起肾脏造血分泌功能的异常。进而发现 APH 组小鼠骨髓 IL-5 和 IL-6 基因表达显著升高,而 M-CSF、IL-1b 和 IL-7 基因表达显著下调,G-CSF 基因表达轻度上调。由于 G-CSF 是调控中性粒细胞生成的关键造血生长因子,可促进粒细胞和造血干细胞增殖分化,并动员骨髓中造血干细胞进入外周血,常用于治疗粒细胞减少症,也是临床上最常用的造血干细胞动员剂<sup>[8,9]</sup>;GM-CSF 能刺激骨髓造血祖细胞增殖和分化,也可辅助调节红细胞生长,作用广泛,在骨髓造血系统中处于重要的地位<sup>[10,11]</sup>。M-CSF 主要刺激巨噬细胞的增殖,属于多功能的造血生长因子,与肿瘤侵袭、复发有关,并调节生殖细胞生长、增殖和分化等。然而 IL-7 主要由骨髓和胸腺基质细胞、角化细胞及黏膜淋巴样组织产生,是一种多潜能的造血生长因子,IL-1b 也参与骨髓造血过程,IL-6 是一种多功能的细胞因子,在造血、免疫应答中发挥重要作用。本研究提示 APH 可抑制小鼠骨髓巨噬细胞集落刺激因子的表达以及 IL-1b 和 IL-7 的基因表达,并促进 IL-5 和 IL-6 基因表

达活跃。有研究发现放射线照射所致血虚证小鼠骨髓 Epo 和 G-CSF 基因表达均被抑制<sup>[12]</sup>,提示 APH 所致血虚证与放射线辐射的机制差异性。

此外,考虑 APH 复制模型小鼠的虚弱状态,进而检测了小鼠肾上腺皮质功能,结果发现参与肾上腺皮质酮合成生化过程的各基因表达均呈现代偿性活跃,尤其以皮质酮合成关键酶 Cyp21a1 与 Cyp11b1 基因表达显著升高,且血液皮质酮分泌量也增加,提示 APH 复制的血虚证模型可能继发小鼠肾上腺皮质功能应激性增强以抵抗外源性应激反应。

综上所述,本研究提示 APH 血虚证模型小鼠突出的特点包括:(1)爪尾唇舌黏膜及皮肤色苍白无光泽;(2)脾脏肿大、胸腺萎缩;(3)血红细胞数量减少或红细胞形态异常,网织红细胞增多;(4)骨髓环状核细胞减少;(5)肾脏 Epo 基因异常高表达、粒细胞和或巨噬细胞集落刺激因子表达异常;(6)小鼠骨髓造血生成因子表达以抑制为主。(7)并继发肾上腺皮质功能亢奋。这些指标的客观变化既有助于评估 APH 血虚证模型程度,又可用于中药干预后疗效评价的客观指标。

利益冲突:无。

#### 参 考 文 献

- [1] 贲长恩,叶百宽.血虚动物模型初探[J].上海中医药杂志,1981,27(6):38-39.
- [2] 金若敏,宁炼,陈长勋,等.血虚模型动物制备及当归补血汤的作用研究[J].中成药,2001,24(4):36-39.
- [3] 卢文丽,方肇勤,潘志强,等.四种不同品系小鼠气虚血虚证候的比较与评价[J].辽宁中医杂志,2007,34(4):519-522.
- [4] 钱宏梁,潘志强.中医血虚证及其动物模型制备方法评析

[J].广州中医药大学学报,2018,35(1):176-181.

- [5] French JK, Winterbourn CC, Carrell RW. Mechanism of oxyhaemoglobin breakdown on reaction with acetylphenylhydrazine[J]. Biochem J, 1978, 173(1): 19-26.
- [6] Winterbourn CC. Protection by ascorbate against acetylphenylhydrazine-induced Heinz body formation in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes[J]. Br J Haematol, 1979, 41(2): 245-252.
- [7] Sathyanarayana P, Dev A, Fang J, et al. EPO receptor circuits for primary erythroblast survival [J]. Blood, 2008, 111(11): 5390-5399.
- [8] McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages[J]. Exp Hematol, 1991, 19(3): 226-231.
- [9] 李程程,孟爱民. G-CSF 动员造血干细胞机制研究进展[J]. 生命科学, 2016, 28(4): 480-485.
- [10] 陈智松,吴志奎,蔡辉国,等.从补肾生血药对衰老小鼠骨髓 GM-CSF 基因转录水平的影响探讨肾生髓的分子基础[J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(4): 28-32.
- [11] 陈笛,王莎莉,王亚平,等.人参总皂甙诱导人骨髓基质细胞表达 GM-CSF 的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2003, 28(4): 405-408.
- [12] 郭平,梁乾德,胡剑江,等.四物汤对放射线致血虚证小鼠骨髓 Epo 和 G-CSF 基因表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(15): 1173-1176.

(收稿:2017-09-11 在线:2018-10-31)

责任编辑:李焕荣

英文责编:张晶晶