

加味四物汤对血小板减少性紫癜小鼠影响的实验研究*

冯晓燕, 顾 鸿, 杨长福, 施建南, 严鲁萍

(贵阳中医学院, 贵州贵阳 520002)

摘要:目的 观察加味四物汤对特发性血小板减少性紫癜(ITP)模型小鼠的药效及免疫方面的影响。方法 用豚鼠抗小鼠血小板血清(GP-APS)建立免疫性 ITP 模型,并用相应药物进行治疗,按用药情况分模型生理盐水组,西药组(泼尼松治疗),中药组(加味四物汤治疗)。观察各组小鼠、骨髓有核细胞计数、血清 IL-6 含量变化及胸腺、脾脏指数等的变化情况。结果 与模型生理盐水组相比西药组与中药组外周血白细胞(WBC)、血小板(PLT)计数,骨髓有核细胞计数均显著升高($P<0.01$),血清 IL-6 含量也显著上升($P<0.01$),胸腺、脾脏指数明显升高($P<0.05$);西药组和中药组的外周血 WBC、PLT,骨髓有核细胞计数,血清 IL-6 组间差异无统计意义($P>0.05$)。结论 加味四物汤可能通过调节细胞免疫、上调血清 IL-6 含量、提高机体免疫功能、改善骨髓造血微环境来实现对 ITP 模型小鼠的治疗作用。

关键词:紫癜,血小板减少性,特发性;加味四物汤;白细胞介素 6;骨髓有核细胞;胸腺指数

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)15-1886-03

Experimental study on the effect of Jiawei Siwu Decoction on thrombocytopenia purpura in mice*

Feng Xiaoyan, Gu Hong, Yang Changfu, Shi Jiannan, Yan Luping

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Jiawei Siwu Decoction for idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP) on the efficacy and immune aspects of the model mice. **Methods** We used guinea pig anti mouse platelet serum immune ITP model, then conduct the corresponding drug treatment. The mice were observed in peripheral blood, bone marrow changes of nuclear cell count, serum IL-6 content and changes in the spleen index. **Results** Compared with the model group of physiological saline of peripheral blood WBC, prednisone group and Chinese medicine group PLT count, bone marrow nucleated cell counts were significantly elevated ($P<0.01$), the content of IL-6 in serum were increased significantly ($P<0.01$), no difference between the two treatment groups. Thymus and spleen index increased too ($P<0.05$). **Conclusion** Jiawei Siwu Decoction may be related to the regulation of cellular immunity, increased serum IL-6 content, improve bone marrow hematopoietic microenvironment to achieve therapeutic effects in the ITP mice.

Key words: purpura, thrombocytopenia, idiopathic; Jiawei Siwu Decoction; interleukin-6; nucleated cell of marrow; spleen index

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是一组因外周血中血小板减少而导致皮肤、黏膜或内脏出血的疾病,发病率很高,临床约占出血疾病总数的30%。加味四物汤是贵州省省级名老中医严鲁萍教授和贵阳中医学院第二附属医院血液内科医生在四物汤的基础上总结多年的临床经验,不断探索而成,该方剂用于治疗 ITP 疗效显著。为研究加味四物汤对 ITP 的药效及作用机制,本科用免疫法建立 ITP 动物模型,对此方进行动物实验研究,探讨该药的临床作用及其与免疫因素的关系。

1 材料与方药

1.1 实验动物与药物 KM 小鼠 74 只,体质量 18~22 g 雌雄各半,SPF 级,由长沙市开福区东创实验动物科技服务部提供,合格证号:SCXK(湘)2009-0012。戊巴比妥钠, Sigma 公司产品(货号:P3761)。醋酸泼尼松,市售,浙江仙琚制药股份有限公司生产,国药准字 H133021207,生产批号:1205150。加味四物汤(当归 15 g、白芍 15 g、熟地 12 g、川芎 15 g、太子参 10 g、紫珠草 24 g、土大黄 24 g、枸杞 10 g、黄芪 25 g、茜草根 12 g、侧柏叶 10 g),由贵阳中医学院第二附属医院药剂科提供。将上述药物按人和动物比例折算用量,用蒸馏水浸泡 30 min,煎煮 2 次(30 分钟/次)后,过滤、合并滤液并加热蒸发,制成 100%水煎浓液(含生药量为 1 g/mL),于 4 ℃ 冰箱中保存备

用,使用时常温静置 40 min、充分摇匀。

1.2 仪器与试剂 Muctiskan Go 酶标仪为 Thermo 公司生产。Sysmex XT-2000i 全自动血细胞计数仪,日本生产;IL-6 试剂盒由 R&D 公司提供,生产编号:10-27-907。80-2 离心沉淀器由上海手术器厂生产,弗氏完全佐剂(FCA)和弗氏不完全佐剂(FICA)为 Sigma 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 豚鼠抗小鼠血小板血清(GP-APS)的制备 取 KM 小鼠,5% 戊巴比妥钠麻醉,眼球取全血,乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)抗凝,离心分离血小板,调整血小板数至 1×10^9 / mL;取分离的血小板分别与等量 FCA 和 FICA 混合成油包水状做抗原,取含 FCA 抗原 1 mL 于 0 周注射豚鼠足掌、背及腹部皮下至少 6 位点,取含 FICA 抗原 1 mL 分别于 1、2、4 周注射于豚鼠足掌、背及腹部皮下,每次至少 6 点,第 5 周从豚鼠心脏取不抗凝全血,离心分离血清即为 GP-APS,分装贮存于 -20 ℃ 冰箱。将 GP-APS 从 -20 ℃ 冰箱取出,56 ℃ 水浴 30 min,用等量 KM 小鼠红细胞吸附 2 次,用生理盐水稀释成 1:4 浓度待用。

1.3.2 造模与分组 KM 小鼠 74 只,随机分成健康组 14 只、模型生理盐水组 20 只、西药组 20 只和中药组 20 只,每组雌雄

各半。除健康组外,各组参照参考文献[1-3]造模方法并加以改进,隔日 1 次按每 20 g/100 μ L 腹腔注射 1:4 稀释的 GP-APS,造模第 8 天开始各组均按每 20 g 0.2 mL 剂量灌胃,连续 10 d;其中,模型生理盐水组按每 20 g 0.2 mL 剂量灌胃给生理盐水,西药组以泼尼松按成人 60 mg/d 剂量换算后,按每 10 g 0.01 mg 剂量灌胃,中药组按每 20 g 0.2 mL 剂量灌胃。

1.4 指标及检测方法 实验中观察小鼠的活动量,饮食饮水量,皮毛光泽度、皮肤淤血出血、体质量改变及死亡数量等基本情况。实验结束后通过股动脉取血,EDTA-Na₂ 抗凝,采用全自动血细胞计数分析仪检测外周血,离心分离血清,采用双抗夹心 ELISA 法,按试剂盒说明方法测定血清 IL-6 水平。按文献[4]方法快速剥离股骨,用 6 号针头以 1 mL 生理盐水冲出骨髓,置于 EDTA-Na₂ 抗凝管内,制成骨髓细胞悬液,采用全自动血细胞计数分析仪检测骨髓有核细胞数量。实验结束后处死小鼠,剖胸腹,取胸脾,置于电子天平上称质量;胸腺指数=胸腺质量/体质量,脾脏指数=脾脏质量/体质量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于满足正态性、方差齐性的多组数据之间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验动物一般情况 整个实验期间,正常组小鼠活动量大,行动敏捷,反应灵敏,毛色光泽,体质量均增加,实验结束时小鼠的体质量平均增加 6 g 左右。模型组小鼠第 1 次注射 GP-APS 1 d 后,开始逐渐出现眯眼、毛散乱竖起、活动量减少,鼻部颜色变白,饮食饮水量减少,体质量减轻等现象,造模后第 8 天模型组小鼠逐渐出现了较明显的皮下紫癜,实验结束时模型组小鼠体质量平均减轻 7 g 左右。除健康组没有小鼠死亡外,西药组死亡 6 只,其中雌鼠 4 只,雄鼠 2 只;生理盐水组小鼠死亡 8 只,其中雌鼠 6 只,雄鼠 2 只;中药组小鼠死亡 5 只,雌鼠 3 只,雄鼠 2 只。

2.2 各组小鼠外周血象的变化 与正常组比较,模型组小鼠除 RBC 外 WBC、PLT 均显著降低 ($P < 0.01$)。西药组与中药组外周血 WBC 与 PLT 计数均明显上升 ($P < 0.05$),但中药组上升更显著 ($P < 0.05$)。西药组与中药组比较,外周血 WBC、RBC、PLT 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

2.3 各组小鼠骨髓有核细胞数的变化 与正常组比较,各实验组小鼠骨髓有核细胞数量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型生理盐水组比较,西药组与中药组骨髓有核细胞数量均增加,其中,西药组 $P < 0.05$,中药组 $P < 0.05$,见表 2。

表 1 各组小鼠外周血象

组别	n	WBC($\times 10^9 L^{-1}$)	RBC($\times 10^{12} L^{-1}$)	PLT($\times 10^9 L^{-1}$)
健康组	14	6.67 \pm 1.33	9.53 \pm 0.90	725.14 \pm 124.26
模型生理盐水组	12	3.62 \pm 0.55 ^a	8.58 \pm 2.28	469.75 \pm 160.90 ^a
西药组	14	5.92 \pm 1.40 ^{bc}	9.69 \pm 0.77	581.85 \pm 93.55 ^{ab}
中药组	15	5.41 \pm 1.16 ^{bc}	9.52 \pm 0.63	658.33 \pm 157.38 ^{bc}

^a: $P < 0.01$,与健康组比较;^b: $P < 0.05$,^c: $P < 0.01$,与模型生理盐水组比较。

2.4 各组小鼠血清 IL-6 水平的变化 各模型组小鼠血清 IL-6 水平与健康组比较,均明显下降 ($P < 0.05$),其中,模型生理盐水组下降最多 ($P < 0.01$)。与生理盐水组比较,西药组、中药组血清 IL-6 水平均显著上升 ($P > 0.05$),见表 3。

2.5 各组小鼠胸腺脾脏指数变化 各模型组胸腺指数、脾脏指数

与健康组比较均显著下降 ($P < 0.05$),其中,模型生理盐水组下降最显著 ($P < 0.01$)。与模型生理盐水组比较,西药组,中药组脾脏指数与胸腺指数均有显著上升 ($P < 0.05$),见表 4。

表 2 各组小鼠骨髓有核细胞数

组别	n	骨髓有核细胞数($\times 10^9/L$)
健康组	14	15.10 \pm 3.30
模型生理盐水组	12	7.65 \pm 1.68 ^a
西药组	14	9.52 \pm 1.59 ^{ba}
中药组	15	10.11 \pm 3.25 ^{ca}

^a: $P < 0.01$,与健康组比较;^b: $P < 0.05$,^c: $P < 0.01$,与模型生理盐水组比较。

表 3 各组小鼠血清 IL-6 水平

组别	n	血清 IL-6 含量(pg/mL)
健康组	14	14.937 86 \pm 0.77421
模型生理盐水组	12	12.884 67 \pm 0.844 09 ^a
西药组	14	14.116 21 \pm 1.060 59 ^{ba}
中药组	15	13.784 55 \pm 0.756 32 ^{ba}

^a: $P < 0.01$,与健康组比较;^b: $P < 0.01$,与模型生理盐水组比较。

表 4 各组小鼠脾脏、胸腺指数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脾脏指数	胸腺指数
健康组	14	0.003 92 \pm 0.000 67	0.004 24 \pm 0.001 40
模型生理盐水组	12	0.001 29 \pm 0.00047 ^b	0.002 63 \pm 0.001 57 ^b
西药组	14	0.002 18 \pm 0.000 86 ^{db}	0.003 81 \pm 0.001 42 ^{bc}
中药组	15	0.001 81 \pm 0.000 41 ^{db}	0.003 99 \pm 0.001 49 ^{bc}

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,与健康组比较;^c: $P < 0.05$,^d: $P < 0.01$,与模型生理盐水组比较。

3 讨 论

ITP 属于中医“血证”、“发斑”、“肌衄”、“发斑”、“阴阳毒”“葡萄疫”等范畴,部分严重病例并发脑出血者可归属“中风”范畴。现代医学家将 ITP 命名为“紫癜病”[5]。目前,临床上西医主要应用止血药、糖皮质激素、免疫抑制剂、雄性激素、脾切除术和血浆置换、单抗和促细胞生成因子等进行治疗[6],取得了一定的疗效。但西药治疗存在不良反应大、停药或减量易复发、易反弹等问题。近些年来,中医中药在本病的治疗上取得可喜的成绩,有了很大的进展[7-8],在一定程度上弥补了西医治疗的不足,中药不良反应小,改善症状明显、费用相对低廉、治病根本等。四物汤是祖国医学中经典的补血名方,该方用血中之血药熟地、白芍配伍血中之气药当归、川芎,动静结合,刚柔相济,使血虚能补、血瘀能行、血燥能润、血溢能止,达到补血不滞血、和血不伤血的目的[9]。加味四物汤是在四物汤原方基础上,佐以益气健脾、养阴清热的中药而成。有研究表明,该药方能提升 PLT 水平、改善粒系病态造血,对再生障碍性贫血、ITP 有较好疗效[10-11]。研究表明,黄芪及其合剂对 PLT 的恢复有促进作用[12],促进骨髓粒系造血,使骨髓体外培养粒细胞、巨噬细胞(CFU-GM)集落数明显增加[13]。

ITP 的病因和发病机制到目前仍不很明确,除了认为细菌或病毒感染与其发病有密切关系,与肝脾的作用有关外,不少的研究表明是体液免疫、细胞免疫及巨核细胞等的调控异常和人类细胞抗原遗传多态性等多方面综合作用的结果[14-15]。IL-6 是一种由免疫活性细胞分泌的多功能因子,具有免疫调节及抗肿瘤作用,同时也有显著的造血调控作用。它的生物活性主

要有促进 B 细胞增生分化和分泌抗体,活化 T 细胞和 NK 细胞、刺激肝细胞分泌急性肝细胞蛋白,促进造血干细胞增殖,使垂体分泌促肾上腺皮质激素,使形状细胞分泌神经生长因子样活性物质等。有研究表明细胞因子 IL-6, sIL-2R 参与了 ITP 的发病过程^[16]。

本实验研究结果显示中药方剂加味四物汤具有与泼尼松一样能增加 ITP 模型小鼠外周血 WBC、PLT 水平,促进骨髓有核细胞增殖,使血清 IL-6 的水平明显上升的作用。

参考文献:

- [1] 杨宇飞,周霁祥,麻柔. 免疫性血小板减少性紫癜动物模型的建立[J]. 中华血液学杂志,1994,15(3):160-161.
- [2] 富琦,范颖,王家辉,等. 免疫性血小板减少性紫癜病证结合动物模型建立与评价[J]. 中国中医基础医学杂志,2004,10(2):30-32.
- [3] Alves-Rosa F, Stanganelli C, Cabrera J, et al. Treatment with liposome-encapsulated clodronate as a new strategic approach in the management of immune thrombocytopenic purpura in a mouse model[J]. Blood, 2000, 96(8):2834-2840.
- [4] 付必莽,苏莹珍,何小文,等. 逆向解剖法游离股骨/胫骨快捷制备小鼠骨髓细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(14):2601-2604.
- [5] 陈信义,麻柔,李冬云. 规范常见血液病中医病名建议[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(11):1040-1041.
- [6] 赵永强. 特发性血小板减少性紫癜的诊治进展[J]. 中国

医学科学院学报,2009,31(5):517-521.

- [7] 康世珍. 中医药治疗特发性血小板减少性紫癜述略[J]. 实用中医内科杂志,2004,18(1):15-15,18.
- [8] 唐世锋,杜忠海. 中医药治疗原发性血小板减少性紫癜的临床研究进展[J]. 河北中医,2013,35(3):467-470.
- [9] 冯泳,申惠鹏. 方剂学[M]. 北京:中医古籍出版社,2003:137-142.
- [10] 冯晓燕. 加味四物汤对再生障碍性贫血大鼠模型 IL-2 影响的实验研究[J]. 江西中医学院学报,2009,4(4):55-57.
- [11] 冯晓燕,顾鸿,严鲁萍. 加味四物汤治疗特发性血小板减少性紫癜 46 例[J]. 中外健康文摘,2011,8(27):65-66.
- [12] 哈敏文,李振,何安光,黄芪合剂防治化疗性骨髓抑制的实验研究[J]. 中国医科大学学报,1997,26(5):12-15,25.
- [13] 李美芬,蒋德昭. 黄芪促进小鼠粒系造血[J]. 湖南医科大学学报,1991,16(2):135-137.
- [14] 盛光耀,王春美. 特发性血小板减少性紫癜发病机制研究进展[J]. 实用儿科临床杂志,2010,25(3):157-159.
- [15] Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, et al. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(24):9035-9039.
- [16] 张国利,张剑白,蒋丽鑫. 特发性血小板减少性紫癜患儿血清 IL-6, sIL-2R 的变化及意义[J]. 哈尔滨医科大学学报,2009,43(5):486-489.

(收稿日期:2013-11-06 修回日期:2014-02-24)

(上接第 1885 页)

- cancer stem cells to tamoxifen in vitro[J]. J Biomed Res, 2012, 26(5):325-335.
- [4] Yang X, Sarvestani SK, Moeinzadeh S, et al. Effect of CD44 binding peptide conjugated to an engineered inert matrix on maintenance of breast cancer stem cells and tumorsphere formation[J]. PLoS One, 2013, 8(3):591-597.
- [5] Chen W, Zhang X, Chu C, et al. Identification of CD44⁺ cancer stem cells in human gastric cancer[J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(2):155-159.
- [6] Lun SW, Cheung ST, Cheung PF, et al. CD44⁺ cancer stem-like cells in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma[J]. PLoS One, 2012, 7(4):524-529.
- [7] DeSantis C, Siegel R, Bandi P, et al. Breast cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(6):409-418.
- [8] Charafe-Jauffret E, Ginestier C. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature[J]. Cancer Res, 2009, 69(4):1302-1313.
- [9] Hayashida T, Jinno H, Kitagawa Y, et al. Cooperation of cancer stem cell properties and epithelial-mesenchymal transition in the establishment of breast cancer metastasis[J]. J Oncol, 2011, 22(3):591-602.
- [10] Velasco-Velazquez MA, Popov VM, Lisanti MP, et al. The role of breast cancer stem cells in metastasis and therapeutic implications[J]. Am J Pathol, 2011, 179(1):

2-11.

- [11] Tang H, Deng M, Tang Y, et al. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression[J]. Clin Cancer Res, 2014, 19(20):5602-5612.
- [12] Tang H, Kong Y, Guo J, et al. Diallyl disulfide suppresses proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer through Wnt-1 signaling pathway by up-regulation of miR-200b and miR-22[J]. Cancer Lett, 2013, 340(2):72-81.
- [13] Li B, Song Y, Liu TJ, et al. miRNA-22 suppresses colon cancer cell migration and invasion by inhibiting the expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 and matrix metalloproteinases 2 and 9[J]. Oncology Reports, 2013, 29(1):1932-1938.
- [14] Xiong J, Yu D, Wei N, et al. An estrogen receptor alpha suppressor, microRNA-22, is downregulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer cell lines and clinical samples[J]. FEBS J, 2010, 277(7):1684-1694.
- [15] Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production[J]. Cancer Res, 2013, 73(13):4112-4122.

(收稿日期:2014-01-16 修回日期:2014-03-21)