文章编号:1001-6880(2014)4-0499-05

地榆鞣质对环磷酰胺致小鼠骨髓抑制的保护作用研究

熊永爱[1],邹俊波[1],杨　明[1,2*]

[1]成都中医药大学药学院,成都 611137;[2] 江西中医学院中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004

摘　要:为了观察地榆鞣质对骨髓抑制的保护作用,本文采用腹腔注射环磷酰胺致小鼠骨髓抑制模型。造模成功后,将骨髓抑制小鼠按体重随机分为:模型组、集落刺激因子组、地榆鞣质 20、10、5 mg/kg 三个剂量组,另设正常对照组。连续灌胃 10 d,每天一次,以外周血液白细胞数量、骨髓细胞 DNA 含量和 $CD34^+$ 的表达以及骨髓细胞 O^6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)蛋白的表达为评价指标,研究地榆鞣质对 CTX 所致骨髓抑制的治疗作用。结果显示地榆鞣质可显著升高小鼠外周血 WBC($P<0.05$);显著升高小鼠骨髓 DNA 含量($P<0.05$);显著促进 $CD34^+$ 的表达($P<0.05$);显著促进 MGMT 蛋白的表达($P<0.05$)。通过本研究可以看出地榆鞣质可显著拮抗 CTX 所致小鼠骨髓抑制。

关键词:地榆鞣质;环磷酰胺;骨髓抑制;拮抗

中图分类号:R285.5　　**文献标识码**:A

Protective Effect of Tannins from *Sanguisorba officinalis* on Cyclophosphamide Induced Myelosuppression in Mice

XIONG Yong-ai[1],ZOU Jun-bo[1],YANG Min[1,2*]

[1]*Pharmaceutical College,Chengdu University of Traditional Chinese Medicine,Chengdu 611173,China*;[2]*Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine,Key Lab. of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine,Ministry of Education,Nanchang 330004,China*

Abstract:The objective of this study was to investigate the protective effect of tannins from *Sanguisorba officinalis* (Great Burnet) on myelosuppression in mice. The myelosuppression model was induced by peritoneal injection of cyclophosphamide (CTX). Then the myelosuppression mice were randomly divided into:model group,colony-stimulating factor group,three Great Burnet tannins treatment groups of different dosage (20,10,5 mg/kg),and normal group. The drugs were chronically administrated to myelosuppression mice once a day for 21 days. The counts of peripheral blood leukocytes,DNA contents and $CD34^+$ expression of bone marrow cells and the O^6-methyl guanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression were used as main indexes and were determined. The results showed that Great Burnet tannins significantly increased peripheral WBC ($P<0.05$);significantly elevated bone marrow DNA content ($P<0.05$);significantly promoted the expression of $CD34^+$ ($P<0.05$);also significantly promoted MGMT protein expression ($P<0.05$). Based on these results,it was concluded that Great Burnet tannins can significantly antagonize CTX induced myelosuppression in mice.

Key words:Great Burnet tannins;cyclophosphamide;myelosuppression;antagonism

放化疗作为肿瘤治疗的重要手段,其临床应用广泛。但由于放射线与化疗药物对正常组织细胞与肿瘤细胞的破坏具有无选择性,故而放化疗会导致机体一系列的毒副反应。其中,骨髓抑制较为常见,往往是放化疗被动减量或停药的最常见原因。80%的病人在肿瘤放、化疗过程中均会出现骨髓抑制的现象,从而导致白细胞减少症,临床常出现严重的感染和出血。因此,在放、化疗过程中,保护骨髓造血功能、提升外周白细胞数,对于肿瘤的治疗具有重要的意义。

地榆为蔷薇科植物地榆(*Sanguisorba officinalis*)的干燥根。现代临床应用表明,地榆具有治疗肿瘤患者因放化疗所致的白细胞减少症的功效,经 20 多年的临床验证疗效显著,且服用剂量小,成人日服最大剂量折算为生药材仅为 60 mg。课题前期对地榆进行了相关研究,发现地榆鞣质对化学物质环磷酰胺所致的小鼠骨髓抑制,包括外周血白细胞、血小板数明显降低、骨髓 DNA 含量减少均有显著保护作

收稿日期:2013-05-06　　接受日期:2013-09-27

基金项目:国家自然科学基金项目(81373976)

*通讯作者 Tel:86-013870608983;E-mail:574825214@qq.com

用,揭示地榆升白的物质基础为鞣质[2]。基于前期实验基础,本实验继续采用环磷酰胺(CTX)致小鼠骨髓抑制模型,从骨髓保护角度初步探索地榆鞣质拮抗骨髓抑制的作用机理。

1 材料与仪器

1.1 地榆鞣质制备

地榆饮片,批号 121109,购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,经成都中医药大学中药鉴定教研室卢先明教授鉴定为纯正药材。

地榆鞣质制备方法:取药材 200 g,粉碎为粗颗粒,10 倍量 70% 丙酮超声提取 2 次,每次 1 h,药液滤过,滤液 45 ℃减压回收丙酮至完全,倒出浓缩液,加水至 800 mL,放置 1 h,滤去沉淀,收集滤液,用 3 倍量的水饱和乙酸乙酯萃取 2 次,收集萃取液,45 ℃减压回收乙酸乙酯至完全,倒出浓缩液,置 45 ℃水浴干燥至干,45 ℃真空干燥 12 h,得粗品鞣质。取粗品鞣质,加水 400 mL 溶解,放置 1 h,滤过沉淀,滤液置于蒸发皿中,缓慢喷入明胶溶液 150 mL(5 g 明胶溶于 150 mL 水中),放置 1 h,收集沉淀,冷冻干燥 12 h 后取出,研磨成细分,用 90% 丙酮 500 mL 超声提取 2 h,药液于 45 ℃减压回收丙酮至完全,倒出浓缩液,45 ℃真空干燥 12 h,得纯化鞣质。

1.2 实验动物

KM 小鼠:体重 20 ± 2 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,实验动物质量合格证号:scxkc(川)2008-24。

1.3 仪器与试剂

COULTER EPICS-XL 流式细胞仪(美国 Coulter 公司);全自动血球计数仪(德国 Roche 公司);-80 ℃低温冰箱;日本 OLYMPUS 生物显微镜;低温离心机;恒温水浴锅;SHANDON 薄片离心机;MicromHM 340E 石蜡切片机等。

集落刺激因子(rhG-CSF,批号:121123);环磷酰胺(CTX,批号:20121203),齐鲁制药有限公司生产;鼠抗人 MGMT 单克隆抗体(BA0766)、鼠抗人 $CD34^+$ 单克隆抗体(BA0763),均购自北京博奥森公司。

2 实验方法

2.1 实验分组及给药

SPF 级动物饲养室内恒温 25 ± 2 ℃、恒湿 40% ~60% 条件下饲养小鼠,给予鼠用全价营养颗粒饲料,自由饮水,每天光照 12 h。所有动物适应性喂养 1 周后按体重随机分为:正常组、模型组、阳性组、地榆鞣质高、中、低剂量组,每组 10 只。自实验当天开始,地榆鞣质高、中、低剂量组分别按 20、10、5 mg/kg 剂量灌胃给予地榆鞣质水溶液,正常组、模型组及阳性组小鼠灌胃等体积纯净水,连续 10 d。阳性组小鼠与实验第 7 d 开始按 30 μg/kg 皮下注射 rhG-CSF,连续 3 d。

2.2 动物模型制备及标本采集

实验第 4 d,除空白组外,其余各组小鼠按 80 mg/kg 剂量腹腔注射 CTX,连续 4 d,空白组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。实验第 10 d,各实验组小鼠眼眶取血,用装有抗凝剂的 1.5 mL EP 管收集待测;断颈处死小鼠,取两侧股骨在超净工作台上,除净肌肉和结缔组织,经生理盐水冲洗后在 75% 乙醇中浸泡 2 min,再用无菌眼科小剪子上端剪口,用 5 mL 注射器抽取适量生理盐水注入股骨骨髓腔,反复 2 ~3 遍冲洗其全部有核细胞,离散成单个细胞悬液,注入冻存管内,放入-80 ℃低温冰箱保存待测,

2.3 检测指标及方法

2.3.1 白细胞计数(WBC)

采用全自动血球计数仪对各实验组小鼠外周血白细胞进行计数。

2.3.2 骨髓细胞 DNA 含量

取小鼠左侧骨股,用 0.005 mol/L $CaCl_2$ 冲洗骨髓至离心管中,4 ℃ 放置 30 min 后,2500 rpm 离心 15 min,弃上清,用 0.2 mol/L $HClO_4$ 5 mL 悬浮沉淀,混匀,90 ℃水浴 15 min,流水冷却,3500 rpm 离心 10 min,于 268 nm 处测上清液体的吸光值,0.2 mol/L $HClO_4$ 作空白对照。

2.3.3 骨髓细胞 $CD34^+$ 抗原表达

用含牛血清白蛋白浓度为 0.2% 的 PBS 缓冲液冲出小鼠右侧股骨骨髓细胞,取出 10^6 个细胞离心,弃上清,加入 30 μL 正常小鼠血清以封闭非特异结合位点,再加入 10 μL FITC 标记的大鼠抗小鼠 $CD34^+$ 抗体,对照管加入 10 μL 相应对照抗体,4 ℃避光反应 30 min。加入 2 mL 红细胞裂解液,作用 5 min,洗细胞 2 次,加入终浓度为 3 μg/mL 的 PI 染液,采用流式细胞仪检测骨髓细胞 $CD34^+$ 抗原表达。

2.3.4 骨髓细胞 MGMT 蛋白表达

取部分骨髓,脱水,固定,石蜡包埋切片,HE 染色,采用 Biosens Digital Imaging System 软件对各实

验组小鼠骨髓细胞 MGMT 蛋白积分光密度进行测定。

2.4　统计方法

用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。数据以表示,组间采用单因素方差分析,方差齐者组间进行 LSD 检验,方差不齐者进行 Tamhane's T2 检验。

3　实验结果

3.1　地榆鞣质对小鼠 WBC 的影响

由表 1 可知,与正常组比较,模型组小鼠外周血 WBC 极显著减小;与模型组比较,地榆鞣质高、中、低剂量组小鼠外周血 WBC 均有显著增大,表明地榆鞣质可显著改善 CTX 所致造血干细胞损伤引起的白细胞减少。

表 1　地榆鞣质对小鼠 WBC 的影响($\bar{x} \pm S, n=10$)

Table 1　Effects of Great Burnet tannins on mice's WBC ($\bar{x} \pm S, n=10$)

组别 Group	剂量 Dosage (mg/kg)	WBC ($\times 10^9$/L)
空白组 Blank	–	6.68 ± 0.44[1)]
模型组 Model	–	2.24 ± 0.29
阳性组 Positive control	30 μg/kg	5.85 ± 0.46[2)]
低剂量组 Low-dose sample	5	3.97 ± 0.39[2)]
中剂量组 Middle-dose sample	10	4.55 ± 0.47[2)]
高剂量组 High-dose sample	20	4.92 ± 0.74[2)]

注:与模型组比较,[1)] $P<0.01$,[2)] $P<0.05$。

Note: compare with model group,[1)] $P<0.01$,[2)] $P<0.05$.

3.2　地榆鞣质对小鼠骨髓 DNA 含量的影响

由图 1 可知,与正常组比较,模型组小鼠骨髓 DNA 极含量显著下降;与模型组比较,地榆鞣质高剂量组小鼠骨髓 DNA 含量极显著升高($P<0.01$),中、低剂量组显著升高($P<0.05$),表明地榆鞣质可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓 DNA 凋亡。

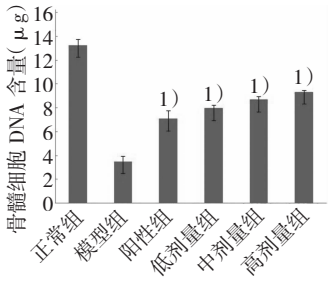


图 1　地榆鞣质对小鼠骨髓 DNA 含量的影响($\bar{x} \pm S, n=10$)

Fig. 1　Effects of Great Burnet tannins on DNA content of mice's marrowcells ($\bar{x} \pm S, n=10$)

注:与模型组比较,[1)] $P<0.01$,[2)] $P<0.05$。

Note: compare with model group,[1)] $P<0.01$,[2)] $P<0.05$.

3.3　地榆鞣质对骨髓细胞 CD34$^+$ 抗原表达的影响

由图 2 可知,与正常组比较,模型组小鼠骨髓细胞 CD34$^+$ 表达率极显著下降;与模型组比较,地榆鞣质高、中剂量组小鼠骨髓细胞 CD34$^+$ 表达率极显著升高($P<0.01$),低剂量组显著升高($P<0.05$),表明地榆鞣质可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓造血干细胞损伤。各实验组小鼠骨髓造血干细胞 CD34$^+$ 流式细胞检测见图 3。

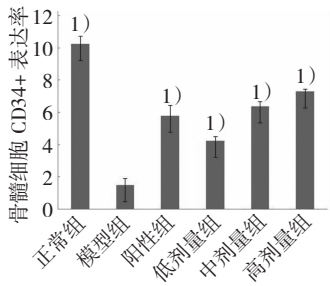
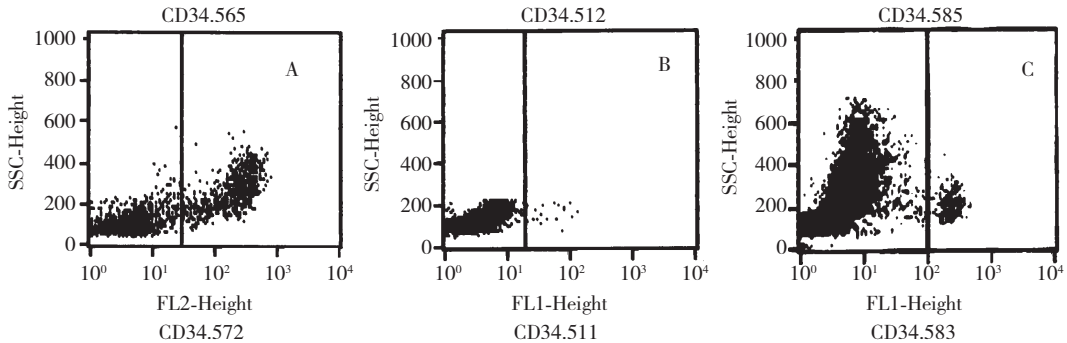


图 2　地榆鞣质对小鼠骨髓细胞 CD34$^+$ 表达的影响($\bar{x} \pm S, n=10$)

Fig. 2　Effects of Great Burnet tannins on the CD34$^+$ expression of mice's marrow cells ($\bar{x} \pm S, n=10$)

注:与模型组比较,[1)] $P<0.01$,[2)] $P<0.05$。

Note: compare with model group,[1)] $P<0.01$,[2)] $P<0.05$.



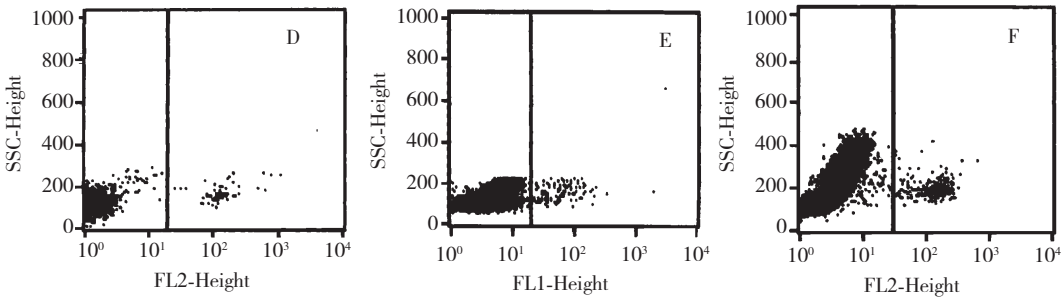


图 3 小鼠骨髓细胞 CD34⁺流式细胞检测图片

Fig. 3 FCM images of CD34⁺ in mice's marrow cells

A:正常组;B:模型组;C:阳性组;D:低剂量组;E:中剂量组;F:高剂量组。

A:normal group, B:model group, C:positive control group, D:low-dose sample group, E:middle-dose sample group and F:high-dose sample group.

3.4 地榆鞣质对骨髓细胞 MGMT 蛋白表达的影响

由图 4 可知,与正常组比较,模型组小鼠骨髓细胞 MGMT 蛋白表达率极显著下降;与模型组比较,地榆鞣质高剂量组小鼠骨髓细胞 MGMT 蛋白表达率极显著升高($P<0.01$),中、低剂量组显著升高($P<0.05$),表明地榆鞣质可显著促进小鼠骨髓 DNA 修复蛋白的表达。各实验组小鼠骨髓造血干细胞 MGMT 蛋白免疫组织化学检测分别见图 5。

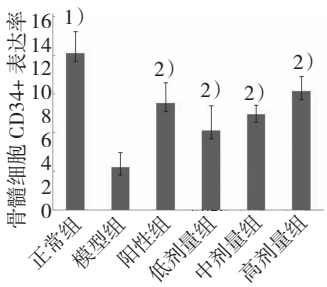


图 4 地榆鞣质对小鼠骨髓细胞 MGMT 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm S, n=10$)

Fig. 4 Effects of Great Burnet tannins on the MGMT expression of mice's marrow cells ($\bar{x} \pm S, n=10$)

注:与模型组比较,[1)] $P<0.01$,[2)] $P<0.05$。

Note: compare with model group, [1)] $P<0.01$, [2)] $P<0.05$.

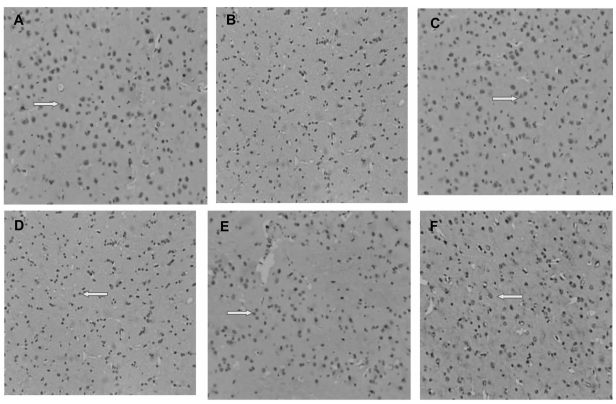


图 5 小鼠骨髓细胞 MGMT 免疫组织化学检测图片

Fig. 5 Immunohistochemistry images of MGMT protein in mice's marrow cells

A:正常组;B:模型组;C:阳性组;D:低剂量组;E:中剂量组;F:高剂量组。

A:normal group, B:model group, C:positive control group, D:low-dose sample group, E:middle-dose sample group and F:high-dose sample group.

4 讨论

血细胞按照发育阶段分为干、祖和成熟细胞。造血细胞的增殖、分化、成熟及程序死亡是一个连续的动态过程。CD34 抗原选择性的表达于造血干/祖细胞膜上,是一种特征性标志[3-5]。最早期的造血祖细胞 CD34 表达最高,随着细胞的分化、成熟,CD34 抗原逐渐减少直至消失。CD34⁺细胞是研究造血调控机理、干细胞移植和基因治疗等理想的靶细胞。目前 CD34⁺造血干/祖细胞移植已成为根治恶性血液病及某些实体瘤的方法,还可用于遗传病和肿瘤的基因治疗。本文采用流式细胞技术对骨髓细胞 CD34⁺的表达进行检测,旨在初步研究地榆鞣质对造血干/祖细胞的增殖和分化作用。结果显示,地榆鞣质可显著升高 CTX 所致小鼠骨髓细胞 CD34⁺的表达,提示地榆鞣质可明显促进骨髓抑制情况下造血干/祖细胞的增殖和分化。

O^6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)是一种高效的 DNA 直接修复酶,能修复 DNA 序列中的 6-氧-甲基鸟嘌呤即烷化基团对细胞 DNA 的损伤,达到保护细胞的作用,尤其与 DNA 烷基化损伤的修复密切相关[6,7]。它是一种迅速的、直接的修复方

式,在 DNA 损伤修复的早期发挥了重要的作用。实验结果显示,MGMT 蛋白虽然是高表达参与细胞自身的修复,但 MGMT 蛋白是一种自杀蛋白,随着 DNA 修复的进行,则逐渐减少,针地榆鞣质可促进 MGMT 蛋白的表达,增强骨髓细胞 DNA 直接修复功能,减轻骨髓抑制,提升骨髓细胞 DNA 含量和白细胞数量。

肿瘤综合治疗在关注肿瘤局部的同时要顾全整体机能,其中机体免疫功能和机体对治疗耐受能力是整体机能的一个重要方面。近年来,西医和中医对骨髓抑制机制研究及治疗都取得了显著的进步,但仍然存在许多疑难问题,如单用西药升高白细胞,短期内疗效显著,但久用会对机体产生严重不良反应;而应用惠尔血等血液制品治疗也存在类似问题,且价格昂贵,病人难以承受。因此,研究中药或天然药物中改善骨髓抑制的活性成分成为热点。地榆鞣质也是天然药物宝库中的一员,已有研究显示,地榆鞣质具有显著对抗 CTX 等引起的骨髓抑制而起到保髓生白的作用,但地榆鞣质保髓生白的物质基础及机理尚未明确。因此,课题组会在已有的基础上继续探寻地榆鞣质改善造血干细胞损伤的有效成分或组分,并结合分子药理学、网络药理学等相关学科进行机理探索,开发出真正具有明确的物质基础和作用机理的保髓生白天然药物。

参考文献

1 Yang Y, Xu S, Xu Q, *et al*. Protective effect of dammarane sapogenins against chemotherapy-induced myelosuppression in mice. *Exp Biol Med* (*Maywood*), 2011, 236: 729-735.

2 Su ZT(苏柘僮). The druggability research of Xinsheng capsule based on the mutual inhibition between sanguisorba tannins and saponins in treating leucopenia. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medcine, Ph. D. 2012.

3 Watchman CJ, Bourke VA, Lyon JR, *et al*. Spatial distribution of blood vessels and $CD34^+$ hematopoietic stem and progenitor cells within the marrow cavities of human cancellous bone. *J Nucl Med*, 2007, 48: 645-654.

4 Dao MA, Arevalo J, Nolta JA. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood*, 2003, 101: 112-118.

5 Ng YY, van Kessel B, Lokhorst HM, *et al*. Gene-expression profiling of $CD34^+$ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. *J Leukoc Biol*, 2004, 75: 314-323.

6 Niture SK, Velu CS, Smith QR, *et al*. Increased expression of the MGMT repair protein mediated by cysteine prodrugs and chemopreventative natural products in human lymphocytes and tumor cell lines. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 378-389.

7 Svrcek M, Buhard O, Colas C, *et al*. Methylation tolerance due to an O^6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut*, 2010, 59: 1516-1526.

(上接第 474 页)

5 Page GE. Factors influencing the maximum rates of air drying shelled corn in thin layers. West Lafayette: Purdue University, MSc. 1949.

6 Henderson SM, Pabis S. Grain drying theory. I. Temperature effects on drying coefficients. *J Agric Eng Res*, 1961, 6: 169-174.

7 Midilli A, Kucuk H, Yapar Z. A new model for single layer drying. *Dry Technol*, 2002, 20: 1503-1513.

8 Das I, Das SK, Bal S. Drying kinetics of high moisture paddy undergoing vibration-assisted infrared (IR) drying. *J Food Eng*, 2009, 95: 166-171.

9 Lin XN(林喜娜), Wang XY(王相友), Ding Y(丁莹). Experiment on neural network prediction modeling of far infrared radiation drying for *Agaricus bisporus*. *Transactions CSAM* (农业机械学报), 2010, 5: 110-114.

10 Ponkham K, Meeso N, Soponronnarit S, *et al*. Modeling of combined far-infrared radiation and air drying of a ring shaped-pineapple with/without shrinkage. *Food Bioprod Process*, 2012, 90: 155-164.