

文章编号:1001-6880(2016)6-0852-08

地榆皂苷类成分对环磷酰胺致小鼠骨髓抑制的保护作用研究

代良敏¹,熊永爱¹,杨桂燕¹,林影影¹,杨明^{1,2*}¹ 成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室
—省部共建国家重点实验室培育基地,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:为了观察地榆皂苷类成分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:模型对照组、集落刺激因子组、地榆皂苷 I 5、2.5、0.5 mg/kg 三个剂量组,地榆皂苷 II 5、2.5、0.5 mg/kg 三个剂量组,地榆皂苷元 5、2.5、0.5 mg/kg 三个剂量组,另设正常对照组。连续灌胃 7 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 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)蛋白的表达为评价指标,研究地榆皂苷类成分对 CTX 所致骨髓抑制的治疗作用。结果显示地榆皂苷类成分可显著升高小鼠 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皂苷类成分可显著拮抗 CTX 所致小鼠骨髓抑制。

关键词:地榆皂苷类成分;环磷酰胺;骨髓抑制;保髓作用

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.6.007

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

DAI Liang-min¹, XIONG Yong-ai¹, YANG Gui-yan¹, LIN Ying-ying¹, YANG Ming^{1,2*}¹ Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal, 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* 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 ziuglycoside-I treatment groups (5, 2.5, 0.5 mg/kg), three ziuglycoside-II treatment groups (5, 2.5, 0.5 mg/kg), three Burnet prosapogenins treatment groups (5, 2.5, 0.5 mg/kg) and normal group. The drugs were chronically administered to myelosuppression mice once a day for 7 days. The counts of peripheral blood leukocytes, DNA contents and CD34⁺ expression of bone marrow cells and the O6-methyl guanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression were used as main indexes and were determined. The results showed that *S. officinalis* 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 *S. officinalis* can significantly antagonize CTX-induced myelosuppression in mice.

Key words: *Sanguisorba officinalis*; cyclophosphamide; myelosuppression; Paul marrow effect

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

收稿日期:2015-11-10 接受日期:2016-04-06

基金项目:国家自然科学基金(81373976)

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

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^[1]。课题前期对地榆进行了相关研究,发现地榆皂苷类成分对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用,揭示地榆升白的另一物质基础为皂苷类成分^[2-5]。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皂苷类拮抗骨髓抑制的作用机理。

1 材料与仪器

1.1 地榆总皂苷及皂苷类成分制备

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。

现代研究表明,五环三萜类皂苷在强碱条件下,可生成溶于高浓度乙醇而不溶于低浓度乙醇或水的有机盐^[6]。利用此性质,项目组前期研究发现,地榆皂苷也具有这种理化性质。为制备高纯度的地榆总皂苷,同时为适应工业化大生产的需求,项目组建立了一种以乙醇和氢氧化钠为主要提取纯化原料,在完全脱离传统大孔树脂的使用下,通过三步碱沉法得到了高纯度的地榆皂苷。具体工艺如下:取地榆饮片1 kg,适当粉碎后加8倍量90%乙醇回流提取2次,每次1.5 h,过滤,合并两次提取液,静置放冷后,加10%的NaOH溶液调pH至12~14,静置过夜,离心去沉淀,滤液抽滤得到上清液。上清液减压浓缩成至适当体积,加水适量至乙醇浓度20%左右,用10%的NaOH溶液调pH至11~12,静置12 h,离心收集沉淀;上清液继续用10%的NaOH溶液调pH至12~13,静置12 h,离心收集沉淀;合并两侧沉淀,于70℃减压至干,用无水乙醇回流45 min,过滤,收集滤液,减压回收乙醇至有固体物析出,挥干,所得固体物减压干燥12 h,即得。

取地榆总皂苷样品适量,利用液质分离技术得到地榆皂苷I、地榆皂苷II、皂苷元。

液质分离的地榆皂苷I、II和地榆皂苷元各自的ELSD与HPLC纯度均大于98%,相对得率依次为68%、12%、5%,划分地榆皂苷I与地榆皂苷II的依

据为其结构式的不同。

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)2015-24。

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(美国thermo公司);恒温水浴锅(上海一凯仪器设备有限公司);SHANDON薄片离心机;Microm-HM340E石蜡切片机等。集落刺激因子(rh-G-CSF,批号:150205);环磷酰胺(CTX,批号:20150203),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:正常对照组、模型对照组、阳性对照组、地榆皂苷I高、中、低剂量组,地榆皂苷II高、中、低剂量组,地榆皂苷元高、中、低剂量组,每组10只。自实验当天开始,地榆皂苷I高、中、低剂量组,地榆皂苷II高、中、低剂量组,地榆皂苷元高、中、低剂量组,分别按5、2.5、0.5 mg/kg剂量灌胃给予地榆皂苷I羧甲基纤维素钠溶液,地榆皂苷II羧甲基纤维素钠溶液,地榆皂苷元羧甲基纤维素钠溶液。正常对照组、模型对照组及阳性对照组小鼠灌胃等体积纯净水,连续10 d。阳性对照组小鼠与实验第5 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1 d,除空白组外,其余各组小鼠按20 mg/kg剂量腹腔注射CTX,连续6 d,空白组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。隔天测量动物体重,并记录。实验第5、6、7 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;实验第7 d,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 体重

隔天测量动物体重,并记录。

2.3.2 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。

2.3.3 骨髓细胞DNA含量

取小鼠左侧骨股,用0.005 mol/L CaCl₂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 HClO₄ 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 HClO₄作空白对照。

2.3.4 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106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。

2.3.5 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 数据统计分析

用SPSS 18.0软件进行统计分析。数据以形式表示,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 地榆皂苷类成分对小鼠体重的影响

实验结果表明,各组小鼠体重变化趋势较为一致,无统计学意义。见表1。

表1 榆皂苷类成分对小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of *S. officinalis* tannins on mice weight($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	体重 Body weight		
		5 d	6 d	7 d
模型对照组 Model	20	23.73 ± 0.24	25.68 ± 0.75	27.93 ± 0.59
空白对照组 Blank	-	24.32 ± 0.48	26.83 ± 0.43	28.79 ± 0.13
地榆皂苷I高剂量组 High-dose ziuyuglycoside-I sample	5.0	24.02 ± 0.42	26.28 ± 0.49	28.36 ± 0.59
地榆皂苷I中剂量组 Middle-dose ziuyuglycoside-I sample	2.5	24.23 ± 0.28	26.16 ± 0.58	27.81 ± 0.24
地榆皂苷I低剂量组 Low-dose ziuyuglycoside-I sample	0.5	23.88 ± 0.12	25.77 ± 0.51	26.52 ± 0.34
地榆皂苷II高剂量组 High-dose ziuyuglycoside-II sample	5.0	24.03 ± 0.59	26.12 ± 0.47	28.59 ± 0.79
地榆皂苷II中剂量组 Middle-dose ziuyuglycoside-II sample	2.5	24 ± 0.34	26.13 ± 0.86	28.23 ± 0.68
地榆皂苷II低剂量组 Low-dose ziuyuglycoside-II sample	0.5	24.08 ± 0.62	26.32 ± 0.63	27.43 ± 0.78
地榆皂苷元高剂量组 High-dose Prosapogenins sample	5.0	24.12 ± 0.23	26.34 ± 0.21	28.33 ± 0.33
地榆皂苷元中剂量组 Middle-dose Prosapogenins sample	2.5	24.01 ± 0.41	26.21 ± 0.47	28.45 ± 0.86
地榆皂苷元低剂量组 Low-dose Prosapogenins sample	0.5	24.01 ± 0.13	27.63 ± 0.29	28.71 ± 0.38
阳性对照组 Positive control	0.03	24.18 ± 0.18	24.45 ± 0.29	26.38 ± 0.74

3.2 地榆皂苷类成分对小鼠 WBC 的影响

由表 2 知,与正常对照组比较,模型对照组小鼠外周血 WBC 极显著减小;与模型对照组比较,地榆皂苷 I 高、中、低剂量组,地榆皂苷 II 高、中、低剂量

组,地榆皂苷元高、中、低剂量组小鼠外周血 WBC 均有显著增大,表明地榆皂苷类成分可改善 CTX 所致造血干细胞损伤引起的白细胞减少。

表 2 地榆皂苷类成分对小鼠 WBC 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of *S. officinalis* tannins on WBC of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	WBC ($\times 10^9$)		
		5d	6d	7d
模型对照组 Model	20	$2.31 \pm 0.66^{**}$	$2.24 \pm 0.59^{**}$	$3.15 \pm 0.95^{**}$
空白对照组 Blank	-	5.04 ± 1.56	4.23 ± 0.98	4.82 ± 0.97
地榆皂苷 I 高剂量组 High-dose ziuyuglycoside-I sample	5.0	$4.81 \pm 0.97^*$	$4.76 \pm 0.75^*$	$4.53 \pm 0.79^*$
地榆皂苷 I 中剂量组 Middle-dose ziuyuglycoside-I sample	2.5	3.96 ± 0.93	4.01 ± 1.01	4.13 ± 0.53
地榆皂苷 I 低剂量组 Low-dose ziuyuglycoside-I sample	0.5	3.65 ± 0.34	3.67 ± 0.88	3.95 ± 0.72
地榆皂苷 II 高剂量组 High-dose ziuyuglycoside-II sample	5.0	$4.32 \pm 0.24^*$	$4.03 \pm 0.12^*$	$4.11 \pm 0.29^*$
地榆皂苷 II 中剂量组 Middle-dose ziuyuglycoside-II sample	2.5	3.50 ± 0.14	3.93 ± 0.19	4.23 ± 0.19
地榆皂苷 II 低剂量组 Low-dose ziuyuglycoside-II sample	0.5	3.41 ± 0.34	4.08 ± 0.12	4.13 ± 0.23
地榆皂苷元高剂量组 High-dose Prosapogenins sample	5.0	$4.62 \pm 0.13^*$	$5.02 \pm 0.12^{**}$	$5.19 \pm 0.21^{**}$
地榆皂苷元中剂量组 Middle-dose Prosapogenins sample	2.5	$4.02 \pm 0.21^*$	$4.38 \pm 0.25^*$	$5.01 \pm 0.3^{**}$
地榆皂苷元低剂量组 Low-dose Prosapogenins sample	0.5	$4.09 \pm 0.15^*$	$4.30 \pm 0.32^*$	$4.84 \pm 0.26^*$
阳性对照组 Positive control	0.03	$4.94 \pm 0.33^*$	$5.01 \pm 0.86^*$	$5.03 \pm 0.37^*$

注:与模型对照组比较, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$ 。

Note: compared with model group, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$.

3.3 地榆皂苷类成分对小鼠骨髓 DNA 含量的影响

由表 3 知,与正常对照组比较,模型组小鼠骨髓 DNA 含量显著下降;与模型组比较,地榆皂苷 I 高、中、低剂量组小鼠骨髓 DNA 含量显著升高 ($P < 0.05$), 表明地榆皂苷 I 可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓 DNA 凋亡;与模型组比较,地榆皂苷 II 高、中、低剂量组小鼠骨髓 DNA 含量显著升高 ($P < 0.05$), 表明地榆皂苷 II 可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓 DNA 凋亡;与模型组比较,地榆皂苷元高剂量组小鼠骨髓 DNA 含量极显著升高 ($P < 0.01$), 中、低剂量组显著升高 ($P < 0.05$), 表明地榆皂苷元可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓 DNA 凋亡。

3.4 地榆皂苷类成分对骨髓细胞 CD34⁺ 抗原表达的影响

由表 4 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,地榆皂苷 I 高、中、低剂量组小鼠骨髓细胞 CD34⁺ 表达率显著升高 ($P < 0.05$), 表明地榆皂苷 I 可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓 DNA 凋亡;与模型组比较,地榆皂苷 II 高、中剂量组小鼠骨髓细胞 CD34⁺ 表达率显著升高 ($P < 0.05$), 表明地榆皂苷 II 可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓 DNA 凋亡;与模型组比较,地榆皂苷元高、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 ($P < 0.05$), 表明地榆皂苷元可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓 DNA 凋亡。

表3 地榆皂苷类成分对小鼠骨髓DNA含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 3 Effects of *S. officinalis* tannins on DNA content of mice marrowcells ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	骨髓DNA含量 Bone marrow DNA content
模型对照组 Model	20	3.12 ± 0.13
空白对照组 Blank	-	12.52 ± 0.45 **
地榆皂苷I高剂量组 High-dose ziuyglycoside-I sample	5.0	8.12 ± 0.13 *
地榆皂苷I中剂量组 Middle-dose ziuyglycoside-I sample	2.5	7.97 ± 0.74 *
地榆皂苷I低剂量组 Low-dose ziuyglycoside-I sample	0.5	7.86 ± 0.79 *
地榆皂苷II高剂量组 High-dose ziuyglycoside-II sample	5.0	8.01 ± 0.11 *
地榆皂苷II中剂量组 Middle-dose ziuyglycoside-II sample	2.5	7.98 ± 0.23 *
地榆皂苷II低剂量组 Low-dose ziuyglycoside-II sample	0.5	7.15 ± 0.65 *
地榆皂苷元高剂量组 High-dose Prosapogenins sample	5.0	9.16 ± 0.54 **
地榆皂苷元中剂量组 Middle-dose Prosapogenins sample	2.5	8.02 ± 0.27 *
地榆皂苷元低剂量组 Low-dose Prosapogenins sample	0.5	7.34 ± 0.53 *
阳性对照组 Positive control	0.03	7.12 ± 0.11 *

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

Note: compared with model group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

表4 地榆皂苷类成分对小鼠骨髓细胞CD34⁺表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 4 Effects of *S. officinalis* tannins on the CD34⁺ expression of mice's marrow cells ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	骨髓细胞CD34 ⁺ 表达率 The expression of CD34 ⁺ bone marrow cells
模型对照组 Model	20	2.12 ± 0.58
空白对照组 Blank	-	8.52 ± 0.94 **
地榆皂苷I高剂量组 High-dose ziuyglycoside-I sample	5.0	5.12 ± 0.32 *
地榆皂苷I中剂量组 Middle-dose ziuyglycoside-I sample	2.5	4.97 ± 0.67 *
地榆皂苷I低剂量组 Low-dose ziuyglycoside-I sample	0.5	4.86 ± 0.58 *
地榆皂苷II高剂量组 High-dose ziuyglycoside-II sample	5.0	5.01 ± 0.35 *
地榆皂苷II中剂量组 Middle-dose ziuyglycoside-II sample	2.5	4.98 ± 0.12 *
地榆皂苷II低剂量组 Low-dose ziuyglycoside-II sample	0.5	4.15 ± 0.37 *
地榆皂苷元高剂量组 High-dose Prosapogenins sample	5.0	6.16 ± 0.27 **
地榆皂苷元中剂量组 Middle-dose Prosapogenins sample	2.5	6.02 ± 0.28 *
地榆皂苷元低剂量组 Low-dose Prosapogenins sample	0.5	5.34 ± 0.75 *
阳性对照组 Positive control	0.03	6.13 ± 0.59 *

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

Note: compared with model group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

3.5 地榆鞣质对骨髓细胞 MGMT 蛋白表达的影响

由表 5 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,地榆皂苷 I 高、中、低剂量组小鼠骨髓细胞 MGMT 蛋白表达率极显著升高($P < 0.01$),表明地榆皂苷 I 可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓 DNA 凋亡;与模型组比较,地榆皂苷 II 高、中剂量组小鼠骨髓细胞 MGMT 蛋白表达率显著升高($P < 0.01$),低剂量组

显著升高($P < 0.05$),表明地榆皂苷 II 可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓 DNA 凋亡;与模型组比较,地榆皂苷元高、中、低剂量组小鼠骨髓细胞 CD34⁺ 表达率极显著升高($P < 0.01$),表明地榆皂苷元可显著修复 CTX 所致小鼠骨髓 DNA 凋亡。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 1。

表 5 地榆皂苷类成分对小鼠骨髓细胞 MGMT 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of *S. officinalis* tannins on the MGMT expression of mice's marrow cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	骨髓细胞 MGMT 蛋白表达率 MGMT protein expression of bone marrow cells
模型对照组 Model	20	2.10 ± 0.21
空白对照组 Blank	-	11.52 ± 0.19 **
地榆皂苷 I 高剂量组 High-dose ziyuglycoside-I sample	5.0	8.02 ± 0.76 * *
地榆皂苷 I 中剂量组 Middle-dose ziyuglycoside-I sample	2.5	7.67 ± 0.53 * *
地榆皂苷 I 低剂量组 Low-dose ziyuglycoside-I sample	0.5	7.26 ± 0.69 * *
地榆皂苷 II 高剂量组 High-dose ziyuglycoside-II sample	5.0	7.95 ± 0.48 * *
地榆皂苷 II 中剂量组 Middle-dose ziyuglycoside-II sample	2.5	7.01 ± 0.49 * *
地榆皂苷 II 低剂量组 Low-dose ziyuglycoside-II sample	0.5	6.94 ± 0.69 * *
地榆皂苷元高剂量组 High-dose Prosapogenins sample	5.0	9.06 ± 0.65 * *
地榆皂苷元中剂量组 Middle-dose Prosapogenins sample	2.5	8.92 ± 0.43 * *
地榆皂苷元低剂量组 Low-dose Prosapogenins sample	0.5	7.84 ± 0.59 * *
阳性对照组 Positive control	0.03	7.23 ± 0.11 *

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

Note: compared with model group, * * $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

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^[7-9]。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。

O⁶-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^[10,11]。它是一种迅速的、直接的修复方

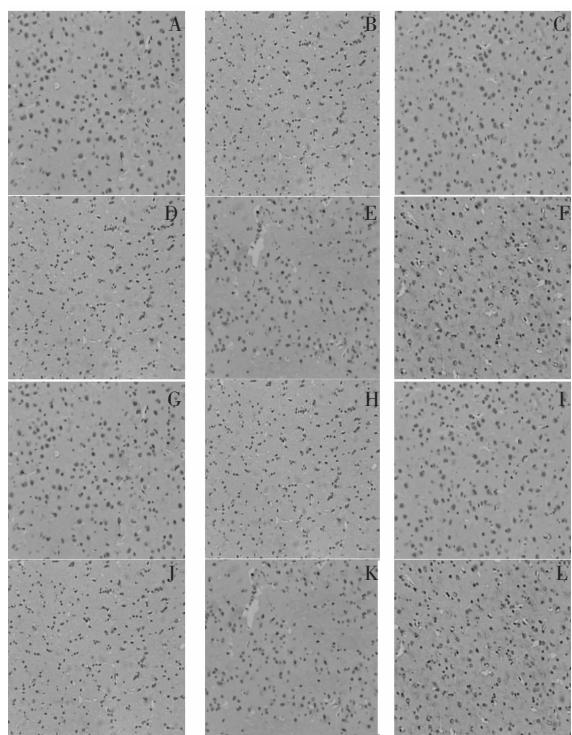


图1 正常对照组(A)、模型对照组(B)、阳性对照组(C)、地榆皂苷I低剂量组(D)、地榆皂苷I中剂量组(E)、地榆皂苷I高剂量组(F)、地榆皂苷II低剂量组(G)、地榆皂苷II中剂量组(H)、地榆皂苷II高剂量组(I)、地榆皂苷元低剂量组(J)、地榆皂苷元中剂量组(K)及地榆皂苷元高剂量组(L)小鼠骨髓细胞MGMT免疫组织化学检测图片

Fig. 1 Immunohistochemistry images of MGMT protein in mice's marrow cells of normal group (A), model group (B), positive control group (C), low-dose ziuglycoside-I sample group (D), middle-dose ziuglycoside-I sample group (E), high-dose ziuglycoside-I sample group (F), low-dose ziuglycoside-II sample group (G), middle-dose ziuglycoside-II sample group (H), high-dose ziuglycoside-II sample group (I), low-dose prosapogenins sample group (J), middle-dose prosapogenins sample group (K) and high-dose prosapogenins sample group (L)

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。

地榆作为成方制剂用于骨髓抑制的治疗已有20多年的临床历史,除服用剂量小、疗效显著以外,更重要的是安全无毒副反应。与目前市售的骨髓抑制一线治疗药物相比,地榆具有以下优势:①疗效全面,具有升高全血细胞和保护骨髓造血的双重功能;而生物制剂和化学药物的作用单一,只能针对特定的血细胞减少症。②安全无毒,不刺激肿瘤生长,可保障肿瘤治疗的持续进行,提高了临床肿瘤的治疗效率;而生物制剂和化学药物的毒副作用剧烈,甚至刺激肿瘤的生长,常导致肿瘤治疗的正常进行。③来源广泛,制备工艺简单,因而价格低廉,利于缓解肿瘤患者的经济压力;而生物制剂和化学药物价格相对高昂,对于肿瘤患者无异于雪上加霜。综上,地榆特殊而有效地将保护骨髓和升高白细胞双重功能完美结合,统筹了临床医生的用药需求和患者顺应性及经济压力,有望被开发成临床预防和治疗骨髓抑制不可替代的天然药物。

目前已证实,地榆促血细胞生成的物质基础主要是皂苷和鞣质两类物质,关于鞣质的升白目前已有报道证明,而地榆保髓的另一成分的报道较少,地榆皂苷类成分也是天然药物宝库中的一员,已有研究显示,地榆皂苷具有显著对抗CTX等引起的骨髓抑制而起到保髓生白的作用,但地榆皂苷类成分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皂苷类成分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。

根据已有的研究表明地榆皂苷类成分能够治疗骨髓抑制,而通过地榆皂苷类成分对环磷酰胺致小鼠骨髓抑制的保护作用研究表明地榆皂苷类成分可显著升高小鼠WBC,显著升高小鼠骨髓DNA含量,显著促进CD34⁺的表达,显著促进MGMT蛋白的表达。通过本研究可以看出地榆皂苷类成分可显著拮抗CTX所致小鼠骨髓抑制。表明地榆的皂苷类成分在治疗骨髓抑制的过程中发挥其积极的作用。对于地榆的进一步开发以及治疗骨髓抑制有着积极的意义。

参考文献

- Yan YY, Shu PX, Qiu XX, et al. Protective effect of Dammarane sapogenins against chemotherapy induced myelosup-

- pression in mice. *Pharmacol Toxicol*, 2011, 236;729-735.
- 2 Voog E, Bienvenu J, Warzocha K, et al. Factors that predict chemotherapy-induced myelosuppression in lymphoma patients; role of the tumor necrosis factor ligand-receptor system. *J Clin Oncol*, 2000, 18:325-330.
- 3 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 Medicine (成都中医药大学), PhD. 2012.
- 4 Wang Y, Probin V, Zhou D. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury-Mechanisms of induction and implication for therapy. *Curr Cancer Ther Rev*, 2006, 2:271-279.
- 5 Guo J(郭姣), Tan YZ(谭毓治), Long XY(龙晓英), et al. 升白益血方治疗白细胞减少症 37 例分析与实验研究. *Study J Tradit Chin Med* (中医药学刊), 2001, 19: 371-372.
- 6 Liu HY(刘海宇), Zhang QH(张庆贺), Liu JP(刘金平), et al. Dammarane saponin structure modification progress. *Chin J Exp Tradit* (中国实验方剂学杂志), 2011, 17:269-273.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 Svrcek M, Buhard O, Colas C, et al. Methylation tolerance due to an O6-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 937 页)

- 3 Liu H(刘慧). Production status and development prospects in China mung bean. *Agric Outlook*(农业展望), 2012, 6:36-39
- 4 Tian J(田静), Therry XJ. Genetics of powdery mildew disease resistance in mung bean. *J Hebei Agric Sci*(河北农业科学), 2000, 4(4):38-45.
- 5 Zhang X(张璇), Jiang M(姜敏). Occurrence and control of pest of grain in China. *Agric Tech Equ*(农业技术与装备), 2014, 296(10B):32-34.
- 6 Hammer Schmidt R, Nuckles EM, Kug J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *collectrichum lagenarium*. *Phys Pla Pathol*, 1982, 20:73-82.
- 7 Xiao RF(肖荣凤), Liu B(刘波), Tang JY(唐建阳), et al. Solid-state fermentation of biocontrol agent *Trichoderma harzianum* FJAT-9040 and its efficiency against bitter gourd *Fusarium* wilt. *Chin J Biol Cont* (中国生物防治学报), 2015, 31:508-515.
- 8 Zhang L(张量), Zhang JZ(张敬泽). Isolation and purifica-
- tion of active compound from *Trichoderma viride* and its inhibitory activities against phytopathogens. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2015, 48:882-888.
- 9 Chen J(陈捷), Zhu JW(朱洁伟), Zhang T(张婷), et al. Progress on mechanism and applications of *Trichoderma* as a biocontrol microbe. *Chin J Biol Control* (中国生物防治学报), 2011, 27:145-151.
- 10 Ren FS(任凤山), Wang Y(王燕), Zhai YF(翟一凡), et al. Synergistic effect of *Trichoderma* and several chemical fungicides for control of *Botryosphaeria dothidea*. *North Horti* (北方园艺), 2015, 16:111-115.
- 11 Zhang YZ(张雨竹), Dong XM(董雪梅), Sun DM(孙冬梅), et al. Effect of *Acremonium persicum* fermentation on seeds germination and antioxidant enzymes activity of soybean. *Chin J Oil Crop Sci*(中国油料作物学报), 2014, 36: 519-523.
- 12 Dong XM(董雪梅), Sun DM(孙冬梅), Wang JF(王介夫), et al. Effect of *Acremonium* sp. metabolites on the growth and development of *Helminthosporium carbonum*. *J Mai Sci*(玉米科学), 2014, 22:148-152.