

[药 理]

生血宁片对环磷酰胺致贫血小鼠的作用及机制

黄飞鸿¹, 朱林杰¹, 李迪迪¹, 于 娅¹, 瞿礼萍¹, 邹文俊^{1*}, 吴建明^{2*}
(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 616000; 2. 西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 考察生血宁片(铁叶绿酸钠和叶绿素衍生物)对环磷酰胺致骨髓抑制性贫血小鼠的作用及其分子机制。**方法** 体外实验培养正常小鼠及腹腔注射环磷酰胺小鼠的骨髓有核细胞(BMC),不同剂量的生血宁片处理这些BMC,采用ATP生物发光法测定生血宁片对其BMC增殖。体内实验,采用腹腔注射环磷酰胺复制贫血模型,以低、中、高剂量的生血宁片进行治疗,给药后第7、10、13天测定外周血白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)水平,第10天收集小鼠骨髓细胞,检测其白介素(IL3)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Gm-csf)、干细胞因子(Scf)mRNA表达水平。**结果** 体外实验显示,生血宁片显著提高两类BMC的增殖率($P<0.05$, $P<0.01$);体内实验显示,生血宁片500、353 mg/kg组可显著升高小鼠外周血WBC、RBC、HGB、HCT水平($P<0.05$, $P<0.01$),生血宁片500、353、250 mg/kg组可显著升高骨髓细胞IL3、Scf mRNA表达水平($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 生血宁片促进Scf和IL3 mRNA的表达,从而缓解环磷酰胺引起的骨髓抑制。**关键词:** 生血宁片;骨髓抑制;环磷酰胺;贫血;mRNA表达;IL-3;SCF
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)06-1205-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.001

Effect of Shengxuening Tablets on mice with cyclophosphamide-induced anemia and its mechanism

HUANG Fei-hong¹, ZHU Lin-jie¹, LI Di-di¹, YU Ya¹, QU Li-ping¹, ZOU Wen-jun^{1*}, WU Jian-ming^{2*}
(1. School of Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 616000, China; 2. School of Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effect of Shengxuening Tablets (sodium iron chlorophyllin, chlorophyll derivatives) on mice with cyclophosphamide-induced anemia and its mechanism of action. **METHODS** *In vitro*, the bone marrow mononeuclear cells (BMC) were isolated from the normal mice and myelosuppressive mice that have received intraperitoneal injection of cyclophosphamide. BMC obtained were treated with the different dose of Shengxuening Tablets for eleven days. The proliferation of BMC was measured by ATP bioluminescence assay. *In vivo*, anemia was established by intraperitoneal injection cyclophosphamide, the anemia mice was treated with the low-, middle-, and high- dose of Shengxuening Tablets for thirteen days. On the 7th, 10th and 13th day, the peripheral blood was collected from fundus venous plexus to count WBC, RBC, HGB and HCT. On the 10th day, the bone marrows were collected to measure the mRNA expressions of IL3, Scf and Gm-csf by qPCR analysis. **RESULTS** *In vitro*, Shengxuening Tablets could significantly improve the proliferation of the normal mice BMC and that of myelosuppressive mice induced by cyclophosphamide ($P<0.05$). *In vivo*, the WBC, RBC, HGB and HCT in middle-, and high-dose of Shengxuening Tablets groups and the mRNA expressions of IL3, Scf in low-, middle-, and high- dose of Shengxuening Tablets groups were significantly increased, compared with those of the model group

收稿日期: 2015-12-30
作者简介: 黄飞鸿(1991—),男,硕士生,从事中药临床与应用研究。E-mail: hfhbest@gmail.com
* 通信作者: 吴建明(1981—),男,博士,副教授,从事药物筛选及分子药理研究。Tel: (0830) 3162291, E-mail: wjmjbj@126.com
邹文俊(1966—),女,博士,教授,从事中药临床与应用研究。Tel: (028) 82855465, E-mail: zouwenjun@vip.163.com

($P < 0.05$)。 **CONCLUSION** Shengxuening Tablets can alleviate cyclophosphamide-induced myelosuppressive anemia in mice. Its therapeutic mechanism is possibly related to the improvement of the mRNA expressions of *Il3* and *Scf*.

KEY WORDS: Shengxuening Tablets; myelosuppressive; cyclophosphamide; anemia; mRNA expression; IL-3; SCF

生血宁片是以铁叶绿酸钠和叶绿素衍生物为主要活性成分,用于治疗缺铁性贫血的五类中药新药。据临床报道,本品联用重组人促红细胞生成素(rhEPO)治疗肿瘤相关贫血可获得良好的治疗效果^[1-2]。现有药理学研究表明生血宁片具有促进正常小鼠、失血性贫血大鼠、溶血性贫血小鼠骨髓造血的作用^[3-4],但未见其对骨髓抑制状态下造血功能影响的报道。而放化疗导致的骨髓抑制是肿瘤患者发生贫血的主要因素,生血宁片在临床有着广泛应用,由此本研究为明确单用生血宁片在肿瘤相关贫血的治疗价值,拟采用化疗药物环磷酰胺建立骨髓抑制性贫血模型,观察生血宁片对骨髓抑制性贫血的治疗作用,并从造血干细胞相关生长因子:白介素-3(*Il3*)、干细胞因子(*Scf*)、及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(*Gm-csf*) mRNA 表达水平初步探讨其分子机制,旨在为生血宁片的合理用药提供一定科学依据与实验支撑。

1 材料

1.1 动物 KM 小鼠, SPF 级, 体质量(18 ~ 22 g), 6 ~ 8 周龄, 雌雄各半, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 生产许可证号: SCXK(川)2013-24。

1.2 药品 生血宁片及生血宁片原料药(铁叶绿酸钠及叶绿素衍生物, 武汉联合药业有限责任公司, 批号 20150305); 重组人促红素- β 注射液(rhEPO, 上海罗氏制药有限公司分装, 批号 H0791/01); 环磷酰胺(江苏盛迪医药有限公司, 批号 15071125)。

1.3 仪器与试剂 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司, 型号 SpectraMax M3); 荧光定量 PCR 仪(美国 MJ Research 公司, 型号 CFD-3220 Option 2); 血细胞分析仪(迈瑞南京生物技术有限公司, 型号 BC-2900); 血细胞分析仪稀释液(迈瑞南京生物技术有限公司, 批号 2015073004); 血细胞分析仪溶血剂(迈瑞南京生物技术有限公司, 批号 2015063008); Ficoll Paque Premium 单核细胞分离液(美国 GE healthcare 公司, 批号 10055781); RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司,

批号 8115384); CellTiter-Glo™ 试剂盒(美国 Promega 公司, 批号 0000153673); 逆转录及 qPCR 试剂盒均购买于北京全式金生物技术有限公司; *Il3*、*Scf*、*Gm-csf*、*Gapdh* 引物均自行设计, 于 Invitrogen(美国)英潍捷基上海贸易公司合成。

2 方法

2.1 生血宁片对正常小鼠骨髓有核细胞增殖的影响 参考文献方法^[5], 取 KM 种小鼠 10 只, 雌雄各半, 脱颈椎处死, 分离双侧股骨, 剪去股骨一端, 另一端插入 1 mL 注射器针头, 用无菌 1640 培养基冲洗骨髓至股骨发白, 将收集的骨髓悬液转至离心管, 待其自然沉降后取上清, 将细胞悬液定容至 4 mL, 轻轻沿离心管壁加入 3 mL 单核细胞分离液, 400 $\times$ g 离心 30 min, 收集交界面乳白色层骨髓有核细胞(BMC)细胞, 无血清 1640 培养基洗涤 3 次, 然后加入 1640 培养基(含双抗、10% FBS、10% 马血清)重悬, 即得小鼠 BMC 悬液, 计数并按 4×10^5 /孔接种于 96 孔板中, 培养体系为 180 μ L; 使用 DMSO 溶解生血宁片原料药(由武汉联合药业有限责任公司提供)至 1 g/L, 临用前用 1640 培养基稀释, 每孔加入生血宁片原料药 20 μ L, 起始质量浓度 100 μ g/mL, 3 倍连续稀释至 1.23 μ g/mL; 对照组加入 20 μ L 培养基, 每组设置 3 个平行对照孔。常规培养 5 d, 采用 ATP 生物发光法测定小鼠 BMC 增殖^[6], 按 CellTiter-Glo™ 试剂盒使用说明操作, 使用 M3 多功能酶标仪检测荧光信号, 采用相对发光单位(RLU)表示, 通过 RLU 即可计算细胞增殖率, 增殖率 = $(RLU_{\text{生血宁片组}} - RLU_{\text{对照组}}) / RLU_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

2.2 生血宁片对环磷酰胺致骨髓抑制小鼠 BMC 增殖的影响 取 20 只 KM 小鼠, 雌雄各半, 腹腔注射 100 mg/kg 环磷酰胺, 连续 3 d^[7], 为环磷酰胺处理组; 另取 6 只小鼠腹腔注射等体积生理盐水, 为对照组, 于第 5 天脱颈椎处死, 按“2.1”项方法分离与培养两种小鼠 BMC, 按 4×10^5 /孔接种于 96 孔板中, 培养体系为 180 μ L。环磷酰胺处理组小鼠 BMC 加入 20 μ L 生血宁片原料药(按“2.1”项方法配制), 根据“2.1”项测定结果调整初

始质量浓度为 60 μg/mL，2 倍连续稀释至 3.75 μg/mL；加入 20 μL 培养基设为环磷酰胺处理组；对照组小鼠 BMC，加入 20 μL 培养基设为对照组，每组设置 3 个平行对照孔，常规培养 11 d，使用 ATP 生物发光法测定第 3、5、7、9、11 天的 BMC 增殖。

2.3 生血宁片对环磷酰胺致骨髓抑制性贫血小鼠的影响

2.3.1 分组与给药 小鼠适应性饲养 5 d 后，取 84 只 SPF 级 KM 小鼠，雌雄各半，按体质量随机分为 6 组：对照组，模型组，rhEPO 组，生血宁片 500、353、250 mg/kg 剂量组，分别相当于临床给药等效剂量的 2、1.4、1 倍，每组 14 只（每组预留 2 只，于给药后 10 d 收集骨髓）。rhEPO 组颈部皮下注射 rhEPO 1 000 IU/kg，每 2 d 给药 1 次，其余组每天灌胃给药 1 次，连续给药 13 d。

2.3.2 造模与指标检测 给药第 0、2 天，除对照组外其余小鼠腹腔注射环磷酰胺 100 mg/kg，给药第 6、9、12 天，腹腔注射环磷酰胺 50 mg/kg，给药容量为 10 mL/kg；空白组注射等体积生理盐水。分别于给药后第 7、10、13 天，小鼠眼底静脉丛取血 20 μL，使用血细胞分析仪检测各组小鼠外周血白细胞（WBC）、红细胞（RBC）、血红蛋白（HGB）、红细胞压积（HCT）等指标。第 13 天给药 1 h 后，脱颈椎处死小鼠，取右侧股骨，无菌 1640 培养基冲洗骨髓至股骨发白，移液器轻轻吹打，形成单个骨髓细胞悬液，定容至 1 mL，使用血细胞计数板计数。

2.3.3 qPCR 测定骨髓细胞中 *Il3*、*Scf*、*Gm-csf* mRNA 的表达 给药后第 10 天，根据“2.3.2”项方法收集骨髓细胞，Trizol 法常规提取总 RNA，使用 TransScript 逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA，以 *Gapdh* 为内参，进行 qPCR 检测。*Il3* 引物：正向引物为 5'-GCTCCCAGAACCTGAACT-3'，反向引物为 5'-TCATTCGCAGATGTAGGC-3'，产物片段 180 bp。*Scf* 引物：正向引物为 5'-CGGGAATCCTGTGACTGA-3'，反向引物为 5'-CTCGGGACCTAATGTTGA-3'，产物片段 430 bp。*Gm-csf* 引物：正向引物为 5'-TCCTGGGCATTGTGCTCT-3'，反向引物为 5'-CCTGGGCTTCCTCATTTT-3'，产物片段 415 bp。反应条件均为：55 ℃，30 min（逆转录）；95 ℃、10 min，95 ℃，15 s，60 ℃、1 min（扩增），40 个循环，72 ℃，5 min 最后延伸。以 2^{-ΔΔCt} 表示实验结果，计为与对照组进行比较后的

相对值，对照组设为 1。

2.4 数据统计 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 的 one way ANOVA 进行统计学分析，以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 生血宁片对正常小鼠 BMC 增殖的影响 与对照组相比，生血宁片原料药 33.3、11.1、3.7、1.23 μg/mL 对小鼠 BMC 的增殖率分别为 32.01%、41.48%、26.50%、21.85%，相对发光单位值显著高于对照组（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），表明生血宁片原料药具有促进正常小鼠 BMC 增殖的作用。而生血宁片原料药 100 μg/mL 组对正常小鼠 BMC 表现出抑制作用，提示生血宁片质量浓度太高可引起一定的增殖抑制作用。结果见表 1。

表 1 生血宁片对正常小鼠 BMC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$ ， $n = 3$)
Tab. 1 Effects of Shengxuening Tablets on the proliferation of BMC in normal mice ($\bar{x} \pm s$ ， $n = 3$)

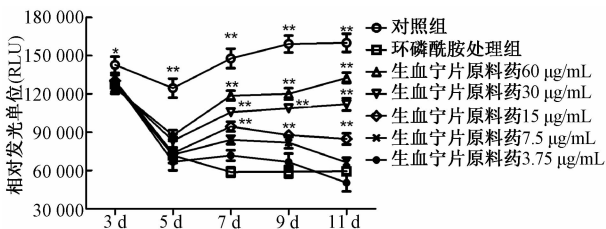
组别	质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	RLU	增殖率/ %
对照组	—	71 544.00 ± 2 178.60	0
生血宁片原料药	100.00	55 544.00 ± 7 219.94	-22.36
生血宁片原料药	33.30	94 445.33 ± 5 869.39 **	32.01
生血宁片原料药	11.10	101 225.33 ± 16 640.03 *	41.48
生血宁片原料药	3.70	90 504.00 ± 6 699.23 **	26.50
生血宁片原料药	1.23	87 182.67 ± 1 634.28 *	21.85

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

3.2 生血宁片对环磷酰胺致骨髓抑制小鼠 BMC 的影响 与对照组相比，自第 3 天起，环磷酰胺处理组 BMC 相对发光单位值逐渐降低，显微镜下可观察到细胞数目明显减少。与环磷酰胺处理组相比，第 7、9、11 天，生血宁片原料药 60、30、15 μg/mL 能显著升高环磷酰胺造模后小鼠骨髓细胞相对发光单位值（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），提示生血宁片原料药 60、30、15 μg/mL 能促进环磷酰胺造模后小鼠骨髓细胞增殖，结果见图 1；显微镜下观察结果显示，随着培养时间延长，环磷酰胺处理组 BMC 形态逐渐发生改变，第 7、11 天，生血宁片原料药 60 μg/mL 组，细胞数目明显增多，且多为未发生形态变化的细胞，结果见图 2。

3.3 生血宁片对环磷酰胺致骨髓抑制性贫血小鼠的影响

3.3.1 生血宁片对骨髓抑制性贫血小鼠外周血常规的影响 与对照组相比，给药后第 10、13 天，模型组小鼠 WBC、RBC、HGB、HCT 显著降低（ $P < 0.01$ ），提示贫血模型建立成功；给药第 10



注：与环磷酰胺处理组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图1 生血宁片对环磷酰胺致骨髓抑制小鼠 BMC 增殖的影响

Fig.1 Effects of Shengxuening Tablets on the proliferation of BMC in myelosuppressive mice induced by cyclophosphamide

天，与模型组相比，生血宁片 353、250 mg/kg 组小鼠 WBC 数目显著升高 ($P < 0.05$)，给药第 10、13 天，与模型组相比，生血宁片 500、353 mg/kg 组小鼠 HGB、RBC、HCT 数目显著升高 ($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)，rhEPO 组小鼠 RBC、HGB、HCT 数目显著升高 ($P < 0.01$)，提示生血宁片对环磷酰胺致骨髓抑制性贫血小鼠外周血象具有明显改善作用，结果见表 2。

3.3.2 生血宁片对骨髓抑制性贫血小鼠 BMC 的影响 给药后第 13 天，与对照组相比，模型组小鼠 BMC 数目显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组相比，生血宁片 250 mg/kg 组 BMC 数目显著升高 ($P < 0.05$)，生血宁 500、353 mg/kg 组 BMC 数目表现出升高趋势，结果见表 3。

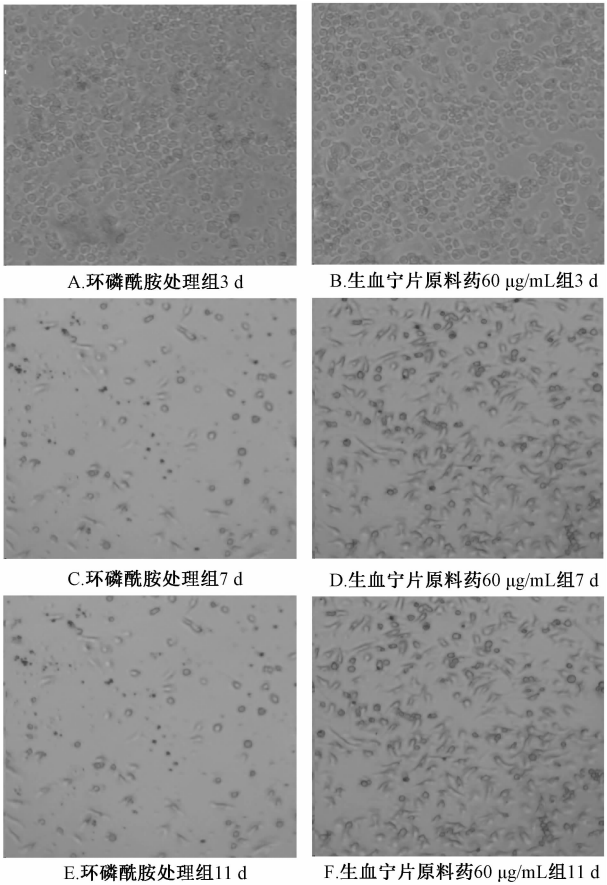


图2 生血宁片对环磷酰胺致骨髓抑制小鼠 BMC 增殖的影响 (200 ×)

Fig.2 Effects of Shengxuening Tablets on the proliferation of BMC in myelosuppressive mice induced by cyclophosphamide (200 ×)

表2 生血宁片对环磷酰胺致骨髓抑制性贫血小鼠外周血常规的影响 ($\bar{x} \pm s$ ， $n = 12$)

Tab.2 Effects of Shengxuening Tablets on peripheral blood cell counts in myelosuppressive anemic mice induced by cyclophosphamide ($\bar{x} \pm s$ ， $n = 12$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	WBC/($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)			HGB/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)		
		7 d	10 d	13 d	7 d	10 d	13 d
空白组	—	6.27 $\pm$ 1.82 **	7.91 $\pm$ 1.99 **	7.67 $\pm$ 1.92 **	134.20 $\pm$ 6.41 *	139.29 $\pm$ 8.71 **	136.75 $\pm$ 9.55 **
模型组	—	3.67 $\pm$ 1.22	3.81 $\pm$ 1.33	2.59 $\pm$ 0.81	126.93 $\pm$ 9.11	117.25 $\pm$ 4.09	120.27 $\pm$ 6.33
rhEPO 组	1 000 IU/kg	3.63 $\pm$ 0.81	4.19 $\pm$ 1.72	3.08 $\pm$ 0.86	133.91 $\pm$ 3.7	137.83 $\pm$ 5.67 **	134.58 $\pm$ 9.32 **
生血宁片组	500	3.59 $\pm$ 1.72	5.05 $\pm$ 1.56	3.42 $\pm$ 1.04	129.21 $\pm$ 7.56	133.42 $\pm$ 8.67 **	128.36 $\pm$ 6.53 *
生血宁片组	353	3.52 $\pm$ 1.37	5.69 $\pm$ 1.96	3.65 $\pm$ 0.59 *	123.50 $\pm$ 4.89	126.55 $\pm$ 5.43 **	125.56 $\pm$ 5.92
生血宁片组	250	3.14 $\pm$ 1.33	4.75 $\pm$ 2.14	4.03 $\pm$ 0.89 *	123.14 $\pm$ 4.85	121.43 $\pm$ 11.69	122.70 $\pm$ 4.69

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	RBC/($\times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$)			HCT/%		
		7 d	10 d	13 d	7 d	10 d	13 d
空白组	—	8.77 $\pm$ 0.46 **	8.93 $\pm$ 0.47 **	8.82 $\pm$ 0.49 **	44.57 $\pm$ 2.43 **	45.46 $\pm$ 2.65 **	44.74 $\pm$ 2.98 **
模型组	—	8.14 $\pm$ 0.46	7.61 $\pm$ 0.23	7.66 $\pm$ 0.25	40.76 $\pm$ 2.82	37.67 $\pm$ 1.94	38.03 $\pm$ 1.98
rhEPO 组	1 000 IU/kg	8.63 $\pm$ 0.58 **	8.50 $\pm$ 0.54 **	8.51 $\pm$ 0.50 **	44.96 $\pm$ 1.23 **	42.85 $\pm$ 3.38 **	46.21 $\pm$ 3.13 **
生血宁片组	500	8.35 $\pm$ 0.56	8.27 $\pm$ 0.53 *	8.27 $\pm$ 0.46 *	42.06 $\pm$ 2.24	42.35 $\pm$ 2.53 **	41.47 $\pm$ 1.67 **
生血宁片组	353	8.04 $\pm$ 0.29	8.06 $\pm$ 0.40 *	8.19 $\pm$ 0.37 *	40.21 $\pm$ 1.45	40.48 $\pm$ 1.54 **	39.95 $\pm$ 1.72
生血宁片组	250	8.05 $\pm$ 0.38	7.85 $\pm$ 0.83	7.70 $\pm$ 0.57	39.96 $\pm$ 1.92	38.85 $\pm$ 3.89	39.21 $\pm$ 1.45

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

表3 生血宁片对环磷酰胺致骨髓抑制性贫血小鼠 BMC 数目的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Tab.3 Effects of Shengxuening Tablets on BMC count in myelosuppressive anemic mice induced by cyclophosphamide ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	BMC/(×10 ⁶ ·mL ⁻¹)
对照组	—	1.97 ± 0.35 *
模型组	—	1.35 ± 0.32
rhEPO 组	1 000 IU/kg	1.34 ± 0.40
生血宁片组	500	1.51 ± 0.28
生血宁片组	353	1.51 ± 0.20
生血宁片组	250	1.72 ± 0.41 *

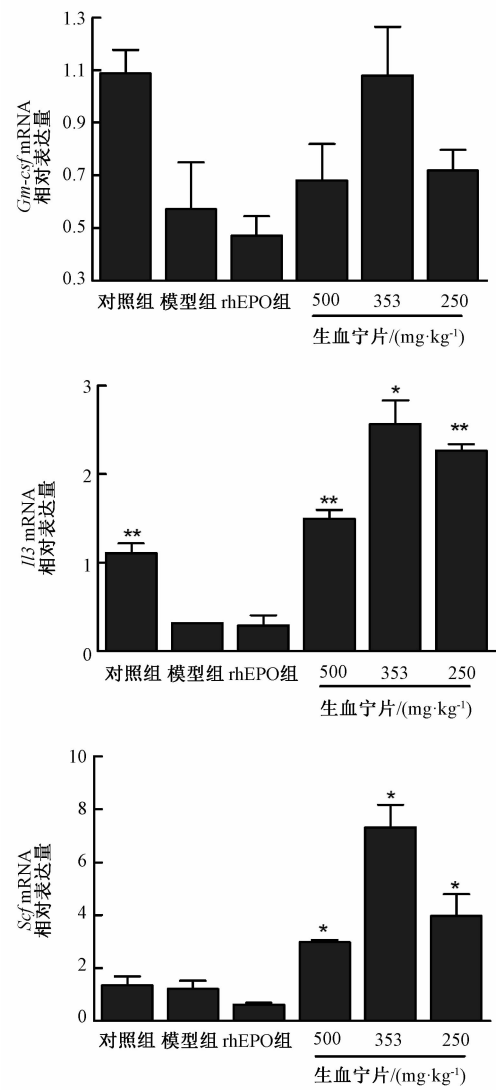
注：与模型组比较，* $P < 0.05$

3.3.3 生血宁片对贫血小鼠骨髓中 *Il3*、*Scf*、*Gm-csf* mRNA 表达的影响 与对照组相比，模型组小鼠 *Il3* mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组相比，给药 10 d，生血宁片 500、353、250 mg/kg 组能升高小鼠 *Scf*、*Il3* mRNA 表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，其中生血宁片 500、353、250 mg/kg 组 *Il3* mRNA 的表达水平为模型组 5、8、7 倍，*Scf* mRNA 的表达水平约为模型组 2、6、3 倍，*Gm-csf* mRNA 的表达水平约为模型组 1.2、1.8、1.2 倍，结果见图 3。

4 讨论

肿瘤相关性贫血 (cancer related anemia, CRA) 是恶性肿瘤常见的伴随疾病之一，发病因素主要包括肿瘤病理因素 (如失血、溶血、骨髓受侵犯) 与肿瘤治疗因素 (如化疗药物作用、放射治疗等)^[8]，其中化疗药物会直接损伤骨髓造血功能引起贫血。文献报道，2009 年对 435 例肿瘤患者观察发现化疗第 4 周期后，贫血发生比例达到 66.0%^[8]；2012 年中国 CRA 调查数据显示，7 972 例肿瘤患者中贫血发生率 60.83%，而随着化疗周期延长，贫血发生率还将进一步提升。由上观之，化疗药物导致骨髓抑制是引发肿瘤相关性贫血的重要因素。

二十世纪初，医学界已关注到叶绿素及其衍生物对贫血的治疗作用^[9-10]，研究发现铁叶绿酸钠由于其结构与血红素相近，能以内吞的形式直接被十二指肠及小肠上段粘膜细胞吸收，发挥补铁作用^[11]，近年来叶绿素衍生物叶绿酸铜钠也逐渐用于治疗再生障碍性贫血^[12]，此外，研究发现叶绿素衍生物能提高辐射小鼠骨髓造血干细胞、祖细胞丰度^[13]。而生血宁片以中药蚕砂作为原料，常温提取叶绿素，经皂化、铁代，形成其主要成分铁叶



注：与模型组比较，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 生血宁片对环磷酰胺致贫血小鼠骨髓细胞中 *Gm-csf*、*Il3*、*Scf* mRNA 水平的影响

Fig.3 Effects of Shengxuening Tablets on the mRNA expressions of *Gm-csf*, *Il3*, *Scf* in anemic mice induced by cyclophosphamide

绿酸钠和叶绿素衍生物。前期研究提示，生血宁片除补铁作用外，还具有促进正常小鼠骨髓红系祖细胞增殖的作用，因此推测生血宁片也可能通过干预化疗患者的骨髓造血功能进而治疗肿瘤相关贫血。本研究在验证生血宁对正常小鼠 BMC 作用的基础上，进一步结合体外和体内环磷酰胺致骨髓抑制性贫血模型，观察其对化疗药物导致骨髓抑制性贫血的治疗作用，结果表明生血宁片能促进骨髓抑制小鼠骨髓有核细胞增殖，升高外周血 WBC、RBC、HGB、HCT 的作用，表明生血宁片具有促进骨髓

抑制性贫血小鼠造血功能的作用。

SCF、IL-3、GM-CSF 属于多谱系生长因子，SCF 能促进多能干细胞向三系髓样干细胞和淋巴干细胞分化，IL-3、GM-CSF 能促进三系髓样干细胞向定向祖细胞分化及定向祖细胞的进一步增殖分化，最终形成成熟的粒细胞、红细胞、血小板^[14-16]。本研究为了确认生血宁片能否通过促进骨髓细胞中造血干细胞增殖，进而发挥其升高外周血 WBC、HGB、RBC、HCT 的作用，采用荧光定量 PCR 对环磷酰胺致骨髓抑制性贫血小鼠的骨髓细胞中 *Il3*、*Scf*、*Gm-csf* mRNA 表达水平进行了测定，实验结果表明，生血宁片能促进小鼠骨髓细胞中 *Scf*、*Il3* mRNA 的表达，提示生血宁片可能通过这种分子机制促进骨髓抑制小鼠骨髓中造血干细胞向三系髓样干细胞分化，进而分化为成熟的红细胞、白细胞，最终升高外周血白细胞、红细胞、血红蛋白数目。

综上，生血宁片对化疗药物环磷酰胺导致骨髓抑制性贫血具有治疗作用，其作用机制可能通过提升细胞生长因子 *Scf*、*Il3* mRNA 的表达，进而促进造血干细胞增殖、分化，从而缓解环磷酰胺引起的骨髓抑制，起到升高外周血细胞，改善化疗引起的贫血作用。此外，本研究只在 mRNA 水平上进行了研究，后续还将通过流式细胞技术及形态方法学进一步分析骨髓中造血干细胞、红系祖细胞、粒系祖细胞相对变化，深入研究生血宁片促进骨髓造血功能的分子机制。

参考文献：

[1] 程 辉,余 丹,张 婷,等. 生血宁治疗肿瘤相关性血细胞减少的临床研究[J]. 湖北中医杂志, 2008, 30(1): 17-18.

[2] 唐烽明,赵 栋,宁 佳,等. 生血宁防治多发性骨髓瘤贫血 32 例分析[J]. 中国保健营养: 临床医学学刊, 2008, 22(17): 34-35.

[3] 陈云亮,钱伯初,王根才,等. 生血宁片治疗贫血模型鼠的实验研究[J]. 湖北中医学院学报, 2005, 7(1):

11-13.

[4] 刘雪莉,陈 凯,史 红,等. 铁叶绿酸钠对正常小鼠祖细胞集落和实验性贫血的影响[J]. 中华血液学杂志, 1997, 18(5): 234-236.

[5] Pierini M, Dozza B, Lucarelli E, *et al.* Efficient isolation and enrichment of mesenchymal stem cells from bone marrow [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(6): 686-693.

[6] 高小平,吴建明,邹文俊,等. 地榆促造血作用的有效部位筛选[J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 137-140.

[7] Diaz-Montero C M, Wang Y, Shao L, *et al.* The glutathione disulfide mimetic NOV-002 inhibits cyclophosphamide-induced hematopoietic and immune suppression by reducing oxidative stress[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(9): 1560-1568.

[8] 马 军,王杰军,张 力,等. 肿瘤相关性贫血临床实践指南 (2015—2016 版) [J]. 中国实用内科杂志, 2015, 35(11): 921-930.

[9] 胡龙勤,许德余. 叶绿素衍生物在医药上的应用[J]. 世界临床药物, 1987, 8(3): 147-153.

[10] Kephart J C. Chlorophyll derivatives—Their chemistry, commercial preparation and uses[J]. *Econ Bot*, 1955, 9(1): 3-38.

[11] 耿丽娜,李亚永,于 鹏,等. 血红素铁的肠铁吸收及调控机制研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(4): 269-276.

[12] 王守军,魏克民. 叶绿素铜钠盐联合中药拆方对免疫介导再生障碍性贫血小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国中医药科技, 2014, 20(6): 618-619.

[13] Suryavanshi S, Sharma D, Checker R, *et al.* Amelioration of radiation induced hematopoietic syndrome by an antioxidant chlorophyllin through increased stem cell activity and modulation of haematopoiesis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 85: 56-70.

[14] Copley M, Beer P, Eaves C. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 690-697.

[15] Golan David E, Tashjian Armen H, Armstrong Ehrin, 等. 药理学原理: 药物治疗学的病理生理基础[M]. 杜冠华, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 793-807.

[16] Hattangadi S M, Wong P, Zhang L, *et al.* From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications[J]. *Blood*, 2011, 118(24): 6258-6268.