

· 论 著 ·

海洋中药蛎昆一号制剂对 5-Fu 化疗后所致 动物骨髓抑制的功效研究

靳艳玲¹, 刘国彦², 莫善列³, 叶 兰⁴, 张宇海⁵

(1. 贵州医科大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 厦门大学药学院/厦门大学附属中山医院, 福建 厦门 361101;

3. 厦门大学药学院-华言科技肿瘤预防与康复研究中心, 福建 厦门 361101;

4. 贵州医科大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025;

5. 厦门大学附属中山医院, 福建 厦门 361101)

摘 要:目的 研究蛎昆一号制剂对 5-氟尿嘧啶(5-Fu)致小鼠骨髓抑制外周血中白细胞、血小板、淋巴细胞、单核细胞计数的影响。方法 纯系雄性 BALB/c 种小鼠 60 只, 随机分为对照组、5-Fu、5-Fu 联用重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)、蛎昆一号制剂低、中、高剂量 6 个组。经腹腔注射肿瘤化疗药 5-Fu 建立小鼠骨髓抑制模型, 对照组注射等量生理盐水; 注射后第 1 天上午使用不同剂量的蛎昆一号制剂灌胃, 对照组等量生理盐水灌胃; 给药 7 d 后上午取眼球血进行血常规分析。结果 小鼠在注射 5-Fu 造模后, 外周血白细胞、血小板、淋巴细胞与对照组相比均有明显降低($P<0.05$), 单核细胞比率与对照组相比明显升高($P<0.05$); 不同剂量的蛎昆一号制剂及阳性对照(rhG-CSF)均有效地升高小鼠外周血白细胞、血小板、淋巴细胞数值, 且单核细胞比率也较模型组明显降低, 但以蛎昆一号制剂中剂量组的效果最为明显, 复方制剂高剂量组次之。结论 蛎昆一号制剂能够明显改善 5-Fu 化疗药物所引起的小鼠骨髓抑制现象, 增加骨髓抑制小鼠外周血白细胞、血小板、淋巴细胞数目; 降低外周血中单核细胞比率, 表明蛎昆一号制剂能够有效的恢复骨髓抑制小鼠造血系统, 提高造血活性。

关键词:蛎昆一号制剂; 5-氟尿嘧啶; 骨髓抑制; 血常规

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2018.21.015

文章编号: 1006-1959(2018)21-0051-05

Efficacy of Marine Chinese Medicine Likun No.1 Preparation on Animal Bone Marrow Suppression Induced by 5-Fu Chemotherapy

JIN Yan-ling¹, LIU Guo-yan², MO Shan-lie³, YE Lan⁴, ZHANG Yu-hai⁵

(1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2. School of Pharmacy, Xiamen University/Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361101, Fujian, China;

3. Institute of Pharmacy, Xiamen University-Huayin Science and Technology Cancer Prevention and Rehabilitation Center, Xiamen 361101, Fujian, China,;

4. College of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

5. Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361101, Fujian, China)

Abstract : Objective To study the effects of Likun No. 1 preparation on the counts of leukocytes, platelets, lymphocytes and monocytes in peripheral blood of mice induced by 5-fluorouracil (5-Fu). **Methods** 60 male BALB/c mice were randomly divided into control group, 5-Fu, 5-Fu combined with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF), Likun No. 1 preparation has 6 groups of low, medium and high doses. The mouse bone marrow suppression model was established by intraperitoneal injection of the tumor chemotherapeutic drug 5-Fu. The control group was injected with the same amount of normal saline. On the first day after the injection, different doses of the Likun No. 1 preparation were administered by the stomach, and the control group was given the same amount of normal saline. After 7 d of administration, eyeballs were taken for routine blood analysis.

Results After injection of 5-Fu, the peripheral blood leukocytes, platelets and lymphocytes were significantly lower than the control group ($P<0.05$), and the monocyte ratio was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). Different doses of Likun No. 1 preparation and positive control (rhG-CSF) effectively increased the peripheral blood leukocyte, platelet and lymphocyte values in

基金项目 厦门市海洋经济发展专项资金(编号 :17GYY001NF01)

作者简介 靳艳玲(1993.12-), 女, 湖北恩施人, 硕士研究生, 研究方向 神经药理学

通讯作者 刘国彦(1973.1-), 男, 江西九江人, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 研究方向 肿瘤机理及药学相关研究

mice, and the monocyte ratio was also significantly lower than that of the model group. The effect of the medium dose group of Likun No.1 preparation was the most obvious, followed by the high dose group of the compound preparation. **Conclusion** Likun No.1 preparation can significantly improve the bone marrow suppression induced by 5-Fu chemotherapy drugs, increase the number of peripheral blood leukocytes, platelets and lymphocytes in mice, and decrease the percentage of monocytes in peripheral blood. Likun No. 1 preparation can effectively restore the hematopoietic system of myelosuppressive mice and increase hematopoietic activity.

Key words Li kun No.1 preparation;5-fluorouracil;Bone marrow suppression;Blood routine

化学治疗是治疗恶性肿瘤的主要方法之一,在化疗过程中产生的不良反应越来越受到关注,尤其是骨髓抑制^[1]。主要表现为外周血白细胞的减少,继而出现血小板减少,骨髓增生降低,严重时可造成感染、出血等现象,甚至导致死亡。我国传统中医学并没有“骨髓抑制”这一病名,后代医家根据骨髓抑制患者的各种临床表现,多将其归入“虚劳”“血症”的范畴^[2]。围绕恶性肿瘤发病机制,从中医理论方面来说,肾为先天之本,肾虚则正气不足,脾主运化,是为后天之本,脾虚则水谷精微运化受阻,易生痰湿,故临床多以补肾健脾的方法进行治疗。蛭昆一号制剂是根据大量临床经验而来,主要由昆布、黄芪、女贞子、茯苓等中草药组成。方中昆布、能软坚散结,黄芪益气扶正以助祛邪消肿、健脾,茯苓清利湿毒,诸药合用,共奏软坚散结,养血活血,清热利湿,益气健脾之功。本文通过观察 5-Fu 对小鼠骨髓抑制外周血变化,探讨蛭昆一号制剂对 5-Fu 造模小鼠骨髓抑制骨髓造血功能的影响,阐述其减弱小鼠骨髓抑制的作用,同时为临床应用此类中药复方制剂对肿瘤治疗中骨髓抑制的影响提供科学的实验数据依据。

1 材料与方

1.1 实验动物 选用 SPF 级健康雄性 BALB/c 种小鼠 60 只,鼠龄 6~8 周,体重 18~22 g,由厦门大学实验动物中心提供 [实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0005],且动物实验员在动物中心培训后即可获得动物实验相关资质,动物适应性喂养 1 周后开始实验。用 Excel 软件对小鼠进行随机分组编号。按动物饲养环境 厦门大学动物实验中心,室内洁净,通风良好,环境温度 20~26℃。动物饲料:混合颗粒鼠饲料,购自厦门大学实验动物中心。

1.2 药物 蛭昆制剂由昆布、牡蛎、黄芪、女贞子、茯苓等中药组成(已申请专利)。蛭昆一号制剂,为蛭昆复方制剂的一号制剂,简称蛭昆一号制剂,由昆布多糖、黄芪、女贞子、茯苓等中草药组成。制法:提取昆布多糖,粉碎成粉末,备用;将黄芪、女贞子、茯苓等加水煎煮 2 次,每次 1 h。合并煎液,喷雾干燥得到细粉,备用。将上述细粉按一定比例搅匀混匀后,

即得。昆布、黄芪、茯苓、女贞子 购自安徽健成医药有限公司。5-氟尿嘧啶 购自天津金耀药业有限公司;批准文号:国药准字 H12020959;产品规格:10 ml、0.25g。重组人粒细胞刺激因子(recombinant human granulocyte colony-stimulating factor rhG-CSF) 阳性对照药物,购自厦门特宝生物工程股份有限公司,产品批号 201710B16;国药准字:S19990042;产品规格 300 μg。

1.3 试剂 0.9%氯化钠注射液 购自广东科伦药业股份有限公司,批准文号:国药准字 H20045198;产品批号:H17111701;规格 500 ml。PBS 缓冲液 购自上海源培生物科技股份有限公司,规格 500 ml。乙醇、NaCO₃、D-葡萄糖、苯酚、硫酸、均为国产分析纯,购自西陇科学股份有限公司。

1.4 主要仪器 离心机 购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;全自动血球分析仪 BC-2300 型 购自上海恒盛医疗器械有限公司;涡旋混合器 购自江苏海门市麒麟医用仪器厂;烘箱 购自上海-恒科学仪器有限公司;水浴锅 购自北京科伟永兴仪器有限公司;紫外分光光度计 UV-1600 购自上海美普达仪器有限公司;膜分离设备 购自成都和诚过滤技术有限公司。

1.5 药物制备

1.5.1 昆布多糖的提取 取昆布,粉碎,过 100 目筛,于密封袋中备用。称取一定量的昆布粉末,加 10 倍 90%无水乙醇水浴 2 h,滤渣按 1:40 加 2% Na₂CO₃ 于 55℃水浴消化 2 h,离心滤液过 1 万分子量分离膜,得浓液加 3 倍乙醇醇析,离心得沉淀物烘干即得昆布粗多糖。

1.5.2 昆布多糖得率计算 烘干后的粗多糖样品称重。粗多糖得率计算公式:多糖得率(%)=烘干昆布多糖(g)/昆布粉末(g)×100%。

1.5.3 多糖含量测定 本实验采用苯酚-硫酸法^[3]测定昆布多糖的含量。其原理是多糖在浓硫酸的作用下,先水解成单糖,并迅速脱水生成糖醛衍生物,与苯酚反应生成橙黄色溶液,在 490 nm 处有特征吸收,与标准系列峰比较,进而对多糖定量。

1.5.4 多糖标准曲线绘制 100 mg/L 标准葡萄糖溶液:称取 0.100 g 葡萄糖于 100 ml 烧杯中,加水溶解,定容于 1000 ml,置 4 ℃冰箱中贮存。分别吸取 0 ml、0.2 ml、0.4 ml、0.6 ml、0.8 ml、1.0 ml 的标准葡萄糖置于 2.0 ml 具塞试管中,用蒸馏水补至 1.0 ml。向试液中加入 1.0 ml 苯酚溶液,然后快速加入 5.0 ml 硫酸(与液面垂直加入,勿接触试管壁,以便与反应液充分混合),静置 10 min。使用涡旋振荡器使反应液充分混匀,然后将试管放置于 30 ℃水浴中反应 20 min,490 nm 测吸光度。以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,制定标准曲线。

1.5.5 样品多糖含量测定 取干燥至恒重的昆布粗多糖,溶于蒸馏水,作适当稀释后配成待测溶液。取 1 ml 多糖样品待测溶液于试管中,加入 5%苯酚 1 ml,浓硫酸 5 ml,使用涡旋振荡器使反应液充分混合,然后将试管放置于 30 ℃水浴中反应 20 min,490 nm 测吸光度。依据多糖标准曲线计算待测样品多糖含量^[4]。

1.5.6 黄芪、女贞子、茯苓混合物提取 黄芪、女贞子、茯苓粉碎成粗粉。第 1 次先加适量水提取(煮沸后保持沸腾 1 h),过滤,收集滤液,滤渣再加入 8 倍水提取(煮沸后保持沸腾 0.5 h),过滤得滤液。合并滤液,单效蒸发弄成至适量浓缩液,浓缩液喷雾干燥得粉末。

1.6 动物模型建立及分组给药 参照文献^[5,6]对小鼠进行骨髓抑制模型造模。将 BALB/c 纯系雄性小鼠随机分为 6 组,即对照组、5-Fu 组、5-Fu 联用 rhG-CSF 组、蛭昆一号制剂组低、中、高 3 个剂量,每组各 10 只。模型组小鼠腹腔注射 5-Fu 0.25 g/kg(对照组腹腔注射等量生理盐水),造模 24 h(第 1 天)后开始给药,连续给药 7 d。按中药药理学研究方法^[7]计算小鼠蛭昆一号制剂的等效剂量为 0.2002 g/(kg·d),并以此将蛭昆一号制剂分为低剂量组、中剂量组、高剂量组,灌胃剂量分别为 0.133g/(kg·d),0.2002g/(kg·d),0.3003 g/(kg·d),体积为 20 ml/kg;对照组和 5-Fu 组灌胃等量生理盐水,参照文献^[8]阳性对照组每只小鼠腹腔注射重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)0.00025 g/kg/d,体积为 10 ml/(kg·d)。

1.7 外周血细胞计数 各组小鼠最后一次给药 24 h 后(第 7 天)取眼球血。左手拇指、食指和中指抓取小鼠的颈部头皮,小指和无名指固定尾巴。轻压需要摘取的眼部皮肤,使眼球充血突出,使用手术剪剪去小鼠的胡须,防止血从胡须处留下引起溶血,用镊

子夹取眼球并快速摘取,并使血液从眼眶内流入 EP 管中。混匀后,用全自动血细胞分析仪检测外周血白细胞、血小板、淋巴细胞及单核细胞含量。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计学分析。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据进行方差齐性检验,组间比较采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示统计学意义显著, $P < 0.001$ 表示统计学意义极显著。

2 结果

2.1 昆布多糖含量测定结果 以 0 mg/ml、0.003 mg/ml、0.006 mg/ml、0.009 mg/ml、0.011 mg/ml、0.014 mg/ml 葡萄糖标准溶液的浓度为横坐标,490 nm 下测定得到标准液浓度的吸光度值为纵坐标,绘制多糖标准曲线如图 1 所示,求得标准曲线方程为 $y = 61.93x + 0.114$ ($R^2 = 0.9954$),式中 y 为 490 nm 下吸光度值, x 为葡萄糖标准品浓度。用苯酚-硫酸法测定昆布多糖样品在 490 nm 吸光值,代入标准曲线方程计算,求得昆布多糖含量为 37.32%,昆布粗多糖提取率为 11.99%。随后与黄芪、女贞子、茯苓等制成蛭昆一号制剂,以探究蛭昆一号制剂对骨髓抑制的影响。

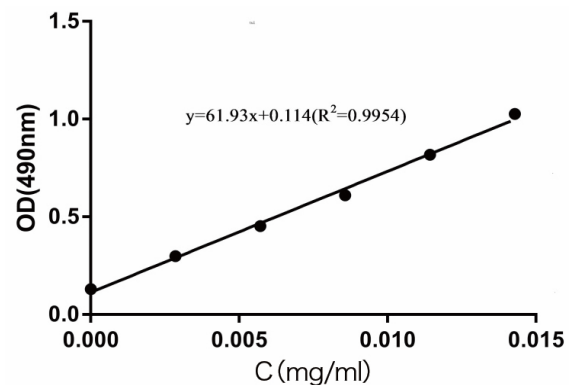


图 1 多糖含量标准曲线

2.2 5-Fu 小鼠骨髓抑制模型 外周血分析结果显示,小鼠在注射 5-Fu 造模后,白细胞、淋巴细胞、血小板与对照组相比均有降低($P < 0.05$),单核细胞比率(MO%)升高($P < 0.05$),造模成功,见表 1。

表 1 蛭昆一号制剂对骨髓抑制小鼠

外周血细胞的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	WBC($\times 10^9/L$)	LY($\times 10^9/L$)	PLT($\times 10^9/L$)	MO%
对照组	3.30 \pm 0.52	3.20 \pm 0.78	938.63 \pm 45.95	0.52 \pm 0.36
5-Fu 组	1.08 \pm 0.37 [#]	1.04 \pm 0.36 [#]	76.12 \pm 31.36 [#]	1.38 \pm 0.59 [#]

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

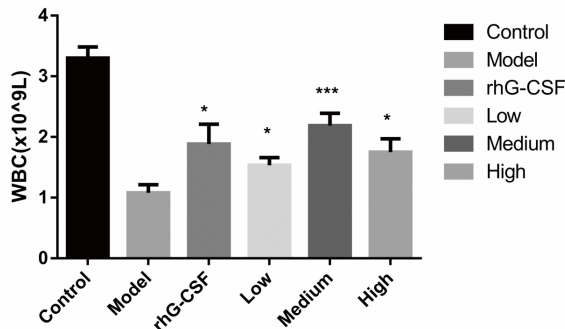
2.3 蛭昆一号制剂对骨髓抑制小鼠外周血象的影响

2.3.1 对骨髓抑制小鼠外周血白细胞的影响 与 5-

Fu 组相比, 蛭昆一号制剂及 rhG-CSF 组外周血白细胞均升高($P < 0.05$)。以制剂中剂量效果更显著($P < 0.01$)。表明蛭昆一号制剂可促进外周血白细胞含量的升高, 见图 2。

2.3.2 对骨髓抑制小鼠外周血淋巴细胞的影响 与 5-Fu 组相比, 蛭昆一号制剂及 rhG-CSF 组外周血淋巴细胞均升高($P < 0.05$)。中、高剂量组间无差异, 如图 3。

2.3.3 对骨髓抑制小鼠外周血血小板的影响 与 5-

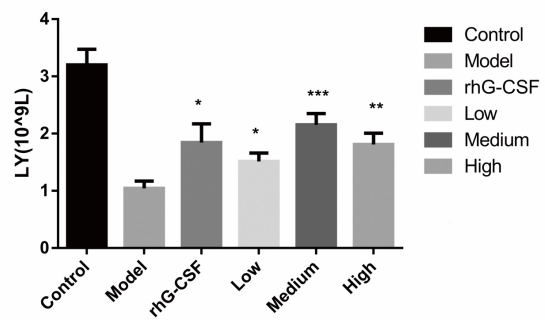


注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$

图 2 蛭昆一号制剂对骨髓抑制小鼠外周血白细胞的影响

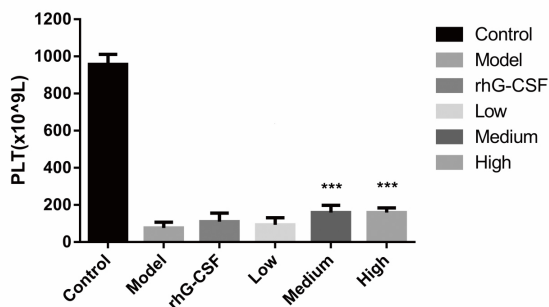
Fu 对照组相比, 低剂量组及 rhG-CSF 组并未有明显地增加血小板效果, 研究表明 rhG-CSF 主要作用为促进白细胞增生药, 不具有促进血小板生成的作用。其中, 蛭昆一号制剂中、高剂量血小板均升高($P < 0.01$), 见图 4。

2.3.4 对骨髓抑制小鼠外周血单核细胞比率的影响 与 5-Fu 对照组相比, 蛭昆一号制剂及 rhG-CSF 组外周血淋巴细胞比率均降低($P < 0.05$), 并以制剂中、高剂量效果更为显著($P < 0.01$), 见图 5。



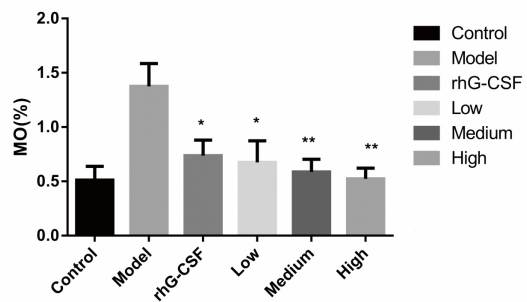
注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

图 3 蛭昆一号制剂对骨髓抑制小鼠外周血淋巴细胞的影响



注:与模型组比较,** $P < 0.001$

图 4 蛭昆一号制剂对骨髓抑制小鼠外周血血小板的影响



注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 5 蛭昆一号制剂对骨髓抑制小鼠外周血单核细胞比率的影响

3 讨论

骨髓抑制是多数化疗药的常见毒性反应, 大多数化疗药均可引起有不同程度的骨髓抑制, 使外周血中血细胞数量减少。血细胞由多种成分组成, 每一种成分都对人体起着不可缺少的作用, 任何一种成分的减少都使机体产生相应的副反应。外周血血细胞减少是骨髓抑制的主要症状, 外周血中的血细胞可间接显示骨髓的造血功能。我国传统医学认为, 肾为先天之本、五脏之根, 肾主骨生髓, 肾的精气充养骨髓, 生髓, 脾为后天之本、气血生化之源。恶性肿瘤发病与脏腑功能失调、病邪瘀毒在体表或体内蕴结有关。化疗药物在抗肿瘤、祛邪毒治疗过程中, 损伤脏腑功能, 脾肾愈虚, 气血生化无源, 致气血不足、肾精亏虚^[10]。在中医辩证论治、整体观念为原则

的理论基础上, 结合临床及基础研究进展, 昆布、丹参、黄芪、茯苓等在中药食疗制剂配伍在中医理论上是可行的。昆布味酸、咸, 能软坚散结、消痰、利水; 丹参味苦、微寒, 有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛的功能; 黄芪味甘、微温, 其功能是补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹; 茯苓味甘、性淡, 具有解毒、除湿、通利关节的功能。从它们的性味归经看, 含昆布、丹参、黄芪、茯苓的配伍是“相须”和“相使”作用, 是具有相互促进作用, 是增强疗效而使用的配伍方法。本文蛭昆一号制剂复方中以这几味药联合使用, 以药物归经结合药物性味、功能作为指导, 使组方选药更有针对性; 使其相互协同, 提高疗效, 或使其相互抑制, 降低不良作用, 更好地发挥药物的效能。

我们根据蛎昆一号制剂生血的功能,验证能否改善肿瘤患者贫血的症状。通过本实验研究可以得出结论,以 5-Fu 为对照,对小鼠给药以低、中、高剂量的蛎昆一号制剂后,骨髓抑制小鼠的外周血淋巴细胞、血小板均有明显升高,表明蛎昆一号制剂可促进骨髓造血功能的恢复,综合表现为以蛎昆一号制剂的中高剂量较为明显的促进骨髓造血功能的恢复。5-Fu 化疗药物能够显著降低外周血白细胞数、升高单核细胞比率,表明 5-Fu 对机体细胞免疫和非特异性免疫均有抑制作用。蛎昆一号制剂联合治疗组白细胞数增多、单核细胞比率降低,单核细胞比率=单核细胞数/白细胞数,由此可见单核细胞比率与白细胞数密切相关,单核细胞还参与免疫反应,在吞噬抗原后将所携带的抗原决定簇转交给淋巴细胞,诱导淋巴细胞的特异性免疫反应。表明蛎昆一号制剂可提高机体特异性和非特异性免疫功能^[11]。由此可见,蛎昆一号制剂对小鼠骨髓抑制治疗效果良好。

我国海洋医药具有坚实的资源基础,海洋生物遗传资源多样性丰富,海洋中药发展前景越来越广阔。我们将以此研究为基础,借助经典中医药典籍的临床疗效和实践经验,进一步探索昆布等海洋中药的医用价值,以期开发出良效的海洋中药口服复方产品,帮助改善肿瘤术后病人的生活质量,延长生存期,具有一定的临床应用价值。

参考文献:

- [1] Brenet F, Kermani P, Spektor R, et al. TGF- β restores hematopoietic homeostasis after myelosuppressive chemotherapy [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(3): 623-639.
- [2] 杨佩颖, 李想, 贾英杰. 补益类中药治疗化疗后骨髓抑制的实验机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(6): 1456-1458.
- [3] 中国实验动物学会. 实验动物环境及设施: GB 14925-2001 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 26.
- [4] 中华人民共和国卫生部. SN/T 4206-2015 出口植物源食品中粗多糖的测定 [S]. 北京: 中国出版社, 2015.
- [5] 张文清, 左萍萍, 徐辰, 等. 海带中岩藻多糖的分离纯化与结构分析 [J]. *食品科学*, 2012, 33(1): 68-71.
- [6] Kopp HG, AVECILLA ST, Hooper AT, et al. Tie2 activation contributes to hemangiogenic regeneration after myelosuppression [J]. *Blood*, 2005, 106(2): 505-513.
- [7] 卢俊钦, 孙文立, 毛文伟. 骨髓抑制-再生小鼠模型的建立及组织学改变的动态观察 [J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2010, 30(7): 758-762.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [9] 沈倍奋, 杨子义, 许锦良, 等. 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的研究 [J]. *中华医学杂志*, 1996, 76(9): 654-657.
- [10] 贾英杰, 于健春, 杨佩颖, 等. 中医药防治化疗致骨髓抑制的临床研究概况 [J]. *辽宁中医杂志*, 2014, 41(10): 2253-2255.
- [11] 栗敏, 马洪宇, 沈继朵, 等. 复方阿胶浆对 H22 肝癌荷瘤小鼠 5-FU 化疗的增效减毒作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(20): 216-219.

收稿日期 2018-8-13 ; 修回日期 2018-8-27

编辑/肖婷婷