

Biochemical Pharmacological Effects of Lurongjing on Young or Old Mice

Wang Yan¹, Chen Xiaoguang²

(1. The first Affiliated Hospital of Jilin University, Changchun 130021; 2. Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Jilin Province, Changchun 130021)

Abstract Objective: To investigate the effect of Lurongjing (LRJ) on young or old mice. Methods: In vivo monoamine oxidase (MAO) and superoxide dismutase (SOD) activities, the contents of monoamines (5-HT, NE, DA), malondialdehyde (MDA), RNA and protein, and the incorporations of [³H]Uridine into RNA and [³H] Leucine into protein in liver tissue were measured. Results: The inhibition of MAO-B activity and the increase of monoamines (5-HT, DA) level, the increase of RNA and protein level, and the incorporations of [³H]Uridine into RNA and [³H] Leucine into protein in liver tissue, the enhancement of SOD activity and the decrease of MDA content in brain and liver tissues were selectively observed in old mice (24 months) than in young mice (1 month) by LRJ (ig, 4.0 g/kg) administrated orally for 10 successive days. Conclusion: LRJ exhibits some anti-aging effect in old mice.

Key words Lurongjing; Monoamine oxidase; Monoamine; RNA synthesis; Protein synthesis; Anti-aging effect

沙棘油重建造血功能的实验研究

陈运贤¹ 钟雪云² 刘天浩³ 葛志红⁴

(1. 中山大学附属第一医院, 广州 510080; 2. 暨南大学医学院, 广州 510630; 3. 中山大学附属孙逸仙纪念医院, 广州 510120; 4. 广东省中医院, 广州 510120)

摘要 目的: 探索沙棘油支持大剂量化疗, 重建化疗后造血功能的可能性。方法: 观察沙棘油灌胃前后小鼠红细胞数目的变化以及沙棘油重建化疗后造血功能障碍动物模型造血功能的作用。结果: 沙棘油灌胃后 DBA/2 小鼠红细胞数升高较明显; SCID 小鼠灌服沙棘油后红细胞及白细胞数均较灌胃前有明显升高, 但血小板数无明显变化; 用沙棘油灌胃治疗化疗后造血功能障碍动物模型, 第 8 天后血细胞数高于阴性对照组, 死亡率减少。结论: 沙棘油能促进红细胞系造血, 并与 G-CSF 一样具有促进化疗后骨髓造血功能恢复的作用。

关键词 沙棘 化疗 造血重建

沙棘 *Hippophae rhamnoides* 是蒙古族、藏族和维吾尔族民间传统草药, 又名醋柳、酸刺。长期以来在民间被应用于口腔溃疡、维生素缺乏症、发热、烧伤、放射性溃疡及肿瘤等疾病的治疗, 对咳嗽痰多、消化不良、食积腹痛、跌扑瘀肿、瘀血闭经也有确切疗效。近年来在治疗再生障碍性贫血、原发性血小板减少性紫癜、白细胞减少症的临床实验中也发现有促进造血作用^[1]。但目前对沙棘重建化疗所造成的机体造血功能障碍的研究尚少。本研究以沙棘油灌胃观察沙棘对小鼠造血功能的作用, 并腹腔注射 5-FU 制作化疗后造血功能障碍动物模型, 探索沙棘油重建化疗后造血功能障碍小鼠造血功能的可能性。

1 材料

1.1 实验动物 近交纯种 DBA/2 雄性小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~24 g (动物合格证号: 粤检字 2002A051); 伴有 T 细胞、B 细胞联合免疫缺陷, 外周血白细胞数减低的严重联合免疫缺陷小鼠 SCID 系小鼠, 雄: 雌为 2:1, 7~8 周龄, 体重 20~26 g (动物合格证号: 粤检字 2001A48)。以上小鼠均购自

中山大学北校区动物中心。SPF 级环境饲养, 饲料、饮水及垫料均经高压灭菌。

1.2 主要试剂与药物 沙棘油购自内蒙古宇航人科技公司, 是由超临界 CO₂ 萃取方法所抽提的沙棘籽油, 纯度 100%, 避光保存; 粒系集落刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF, 商品名津恤力) 为山东格兰百特公司产品; 5-氟尿嘧啶 (5-Fluorouracil, 5-FU) 为广州珠光制药有限公司产品; 含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基、Hank's 液、Tris-NH₄Cl 溶液、无菌 1640 液均为 HyClone 公司产品; 植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA) 为 GIBCO 公司产品; 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 为 FLUKA 公司产品; 酸性异丙醇在使用前临时配制。

1.3 仪器 CA470 血细胞计数仪为瑞典 MEDONIC 公司产品; SW-CJ-IFD 型超净无菌操作台为苏州安泰空气技术有限公司产品。

2 方法

2.1 沙棘油对正常 DBA/2 小鼠造血功能的作用 取近交纯种 DBA/2 雄性小鼠 24 只, 随机分为生

理盐水组和沙棘给药组。生理盐水组小鼠按 0.5 ml/只生理盐水灌胃 (ig), 沙棘给药组小鼠按 0.5 ml/只沙棘油 ig, 连续 6 天。于实验前和末次给药后分别断尾采血 20 μ l, 用 MEDONIC470 血细胞计数仪测定小鼠外周血常规。观察沙棘对小鼠造血功能的作用。

2.2 沙棘油对化疗后造血功能障碍 DBA/2 小鼠的造血重建作用 取近交纯种 DBA/2 雄性小鼠 36 只, 腹腔注射 5-FU 225 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 制作造血功能障碍小鼠动物模型。注射 5-FU 后每只小鼠每天皮下注射硫酸庆大霉素 3.2 mg/kg 和磷酸克林霉素 40 mg/kg , 以防治感染, 连续 14 天。造模后, 即将小鼠随机分为 3 组, 即模型组、沙棘组和 G-CSF 组 (阳性对照组)。模型组小鼠每只 ig 0.5 ml 生理盐水, 沙棘组小鼠 ig 沙棘油 0.5 ml/只, 每天 1 次, 连续 14 天。G-CSF 组隔天 1 次皮下注射 G-CSF 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 连续 7 次。分别于给药第 6、8、10、12、14 天断尾采血 20 μ l, 用 MEDONIC 470 血细胞计数仪测定小鼠外周血常规, 观察各组小鼠化疗后死亡率情况、骨髓抑制期及恢复期血细胞数值的变化。在小鼠化疗后的骨髓抑制期及恢复期取小鼠骨髓与肝脏, 用甲醛固定, 石蜡包埋切片, 显微镜下观察其组织病理学变化。

2.3 沙棘油对严重联合免疫缺陷小鼠 SCID 系小鼠造血功能的作用 取严重联合免疫缺陷小鼠 SCID 系小鼠 36 只, 随机分为生理盐水组 (阴性对照组)、沙棘组和 G-CSF 组 (阳性对照组)。生理盐水组小鼠按 0.5 ml/只 ig 生理盐水, 沙棘组小鼠按 0.5 ml/只 ig 沙棘油, G-CSF 组皮下注射 G-CSF 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每天 1 次, 连续 6 天。于实验前和末次给药后分别断尾采血 20 μ l, 用 MEDONIC 470 血细胞计数仪测定小鼠外周血常规, 观察沙棘对严重联合

免疫缺陷小鼠 SCID 系小鼠造血功能的作用。

2.4 沙棘油对严重联合免疫缺陷小鼠 SCID 系小鼠的造血重建作用 取严重联合免疫缺陷小鼠 SCID 系小鼠 36 只, 腹腔注射 5-FU (150 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 制作造血功能障碍小鼠动物模型。注射 5-FU 后每只小鼠每天皮下注射硫酸庆大霉素 3.2 mg/kg 和磷酸克林霉素 40 mg/kg , 以防治感染, 连续 14 天。造模后, 即将小鼠随机分为 3 组, 分组、给药、处理情况及观察指标均同 2.2。

2.5 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件对所得数据进行统计学处理, 统计方法为配对资料均数 t 检验 (T-test)、单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA)。

3 结果

3.1 沙棘油对正常小鼠造血功能的作用 在用沙棘油灌胃后沙棘组 DBA/2 雄性小鼠的外周血三系均较灌胃前升高, 尤以红细胞数升高较明显 ($P < 0.05$), 但血小板及白细胞数的升高则无统计学差异。生理盐水组小鼠在用生理盐水灌胃前后外周血细胞数没有明显变化。(表 1)

3.2 沙棘油对化疗后造血功能障碍小鼠的造血重建作用 注射 5-FU 第 6 天, 三组 DBA/2 雄性小鼠外周血红细胞、血小板、白细胞数均降至最低, 骨髓造血细胞增生低下, 表明造血功能障碍小鼠动物模型制作成功。化疗后第 8 天沙棘组与 G-CSF 组血细胞数开始升高, 直至第 14 天其白细胞数及血小板数仍持续高于生理盐水组 ($P < 0.01$)。第 12 天起红细胞数也高于生理盐水组。(表 2)

3.3 沙棘油对化疗后造血功能障碍 DBA/2 小鼠死亡率的影响 注射 5-FU 制作造血功能障碍 DBA/2 小鼠动物模型后, 实验过程中沙棘组小鼠有 2 只死亡, 生理盐水组小鼠有 8 只死亡, G-CSF 组有

表 1 沙棘油对正常 DBA/2 小鼠造血功能的作用 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)		PLT ($\times 10^9/\text{L}$)		WBC ($\times 10^9/\text{L}$)	
	灌胃前	灌胃后	灌胃前	灌胃后	灌胃前	灌胃后
沙棘组	9.0 \pm 1.3	13.9 \pm 0.8	1203 \pm 124	1380 \pm 107	9.2 \pm 1.6	10.7 \pm 4.0
生理盐水组	9.4 \pm 1.4	10.6 \pm 0.8	1111 \pm 134	1148 \pm 204	8.1 \pm 2.5	8.6 \pm 1.2

RBC: 红细胞; PLT: 血小板; WBC: 白细胞, 下同

表 2 沙棘油对化疗后造血功能障碍 DBA/2 小鼠的造血重建作用 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	第 8 天			第 10 天			第 12 天		
	RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	PLT ($\times 10^9/\text{L}$)	WBC ($\times 10^9/\text{L}$)	RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	PLT ($\times 10^9/\text{L}$)	WBC ($\times 10^9/\text{L}$)	RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	PLT ($\times 10^9/\text{L}$)	WBC ($\times 10^9/\text{L}$)
生理盐水组	7.1 \pm 0.7	924 \pm 270	9.9 \pm 3.7	7.3 \pm 0.7	1012 \pm 358	10.2 \pm 4.1	6.6 \pm 1.0	956 \pm 219	9.7 \pm 3.52
沙棘组	8.3 \pm 0.9	1183 \pm 269	20.8 \pm 9.0	7.4 \pm 1.2	2492 \pm 283	69.7 \pm 3.2	9.4 \pm 0.4	2712 \pm 850	51.4 \pm 7.9
G-CSF 组	8.5 \pm 0.5	1223 \pm 257	30.7 \pm 7.8	8.7 \pm 0.7	2313 \pm 168	59.1 \pm 5.1	9.4 \pm 0.2	2819 \pm 254	62.7 \pm 3.01

表3 沙棘油对严重联合免疫缺陷小鼠(SCID小鼠)造血功能的作用($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	RBC($\times 10^{12}/L$)		PLT($\times 10^9/L$)		WBC($\times 10^9/L$)	
	灌胃前	灌胃后	灌胃前	灌胃后	灌胃前	灌胃后
生理盐水组	8.95 ± 0.19	8.60 ± 0.96	1437 ± 113	1376 ± 319	5.2 ± 1.1	6.5 ± 2.3
沙棘组	9.16 ± 0.56	12.64 ± 0.71	1460 ± 186	1509 ± 238	5.6 ± 1.1	16.6 ± 8.1

表4 沙棘油对化疗后严重联合免疫缺陷小鼠(SCID小鼠)造血重建作用($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	化疗后第6天			化疗后第10天			化疗后第12天		
	RBC ($\times 10^{12}/L$)	PLT ($\times 10^9/L$)	WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	PLT ($\times 10^9/L$)	WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	PLT ($\times 10^9/L$)	WBC ($\times 10^9/L$)
生理盐水组	7.6 ± 0.3	649 ± 184	3.4 ± 1.4	6.8 ± 1.4	592 ± 122	3.2 ± 1.6	6.1 ± 0.9	610 ± 131	3.6 ± 3.5
沙棘组	7.4 ± 0.3	670 ± 180	3.6 ± 2.7	6.6 ± 0.9	770 ± 186	9.3 ± 1.1	8.5 ± 0.9*	756 ± 190	15.6 ± 4.3
G-CSF组	7.3 ± 0.6	676 ± 151	4.3 ± 2.8	6.1 ± 0.9	620 ± 206	10.7 ± 3.5	6.6 ± 0.6	642 ± 140	15.4 ± 3.5

3只死亡。生理盐水组死亡率高于沙棘组和G-CSF组。病理学检查发现:生理盐水组的胃肠膨胀成气泡状,有明显胀气,胃壁及肠壁菲薄;肝细胞呈广泛灶状坏死,有坏死溶解灶;骨髓造血面积减少,基质细胞变性消失。沙棘组和G-CSF组小鼠胃肠和肝细胞变化不明显,骨髓有灶性造血岛,巨核细胞较生理盐水组增多,基质细胞受损不明显。

3.4 沙棘油对严重联合免疫缺陷小鼠造血功能的作用 SCID小鼠灌服沙棘油后红细胞及白细胞数均较灌胃前有明显升高($P < 0.05$),但血小板数无明显变化(表3)。化疗后第6天,各组造血功能障碍动物模型的外周血血细胞数均下降,组间没有差异。组织病理学检查:生理盐水组骨髓造血面积减少,有大面积骨髓坏死,各系造血细胞呈退行性变;沙棘组和G-CSF组的骨髓增生活跃,三系造血均较正常,肝细胞仅呈散在点状坏死。化疗后第10天沙棘组和G-CSF组小鼠白细胞数明显高于生理盐水组($P < 0.05$),第12天起沙棘组小鼠红细胞值也高于其它两组($P < 0.05$)。(表4)

4 讨论

化疗是治疗恶性肿瘤的一个重要手段。大剂量化疗能提高疗效,但药物剂量加大会抑制骨髓造血功能,损伤造血干细胞和造血微环境,引起严重感染和出血。G-CSF是目前支持大剂量化疗,重建患者造血功能的主要药物,但价格昂贵,许多患者在经济上难以负担。因此开发一种价格低、无毒副作用,能支持大剂量化疗的中草药甚为必要。

沙棘是一种常用的传统草药,经急性毒性试验和临床应用未发现有明显的毒副作用。现代药理分析发现沙棘富含维生素、糖类、氨基酸、脂肪酸和微量元素、黄酮、甾体类物质和大量的超氧化物歧化酶,有一定的血液保护作用及抗辐射、抗肿瘤功能^[2]。本实验选择5-FU腹腔注射制作化疗后造血

功能障碍小鼠模型。化疗后第6天动物模型的血细胞数降至最低水平,骨髓检查示细胞增生低下,死亡率达66.7%,第8天沙棘组血细胞数开始上升,进入骨髓恢复期,与G-CSF组比较无明显差异,均高于用生理盐水灌胃的阴性对照组。结果提示沙棘油与G-CSF一样,亦可促进化疗后的骨髓造血功能恢复。沙棘油促进化疗后的骨髓造血功能重建的可能机制是:(1)沙棘油可改善骨髓造血微环境,有利于造血干细胞生长、增殖和分化^[1]。(2)沙棘具有抗氧化剂的作用,可保护骨髓基质细胞如内皮细胞、网状细胞。本实验的骨髓病理检查可见阴性对照组的基质细胞受损、消失,而沙棘组较为正常。基质细胞是造血重建的重要影响因素,可促进造血干细胞的粘附及造血调节因子的释放,沙棘减轻了基质细胞的损害,使造血因子释放,促进造血干细胞与基质细胞的紧密接触,从而促进造血重建。(3)沙棘富含多种促进细胞生长、分裂的营养成分,如番茄红素、维生素E等,有助于干细胞的增殖分化。(4)沙棘油丰富的抗氧化剂可减少化疗对造血干细胞的破坏,加快造血干细胞的修复,促进化疗后造血功能重建。

在本实验中,DBA/2及SCID小鼠在沙棘灌胃后其红细胞数均明显高于灌胃前。应用化疗药后红细胞数也高于其它两组,提示沙棘可促进红系造血功能,减少红细胞破坏。沙棘含有丰富的维生素B族及叶酸、铁剂、微量元素,可供红细胞生长必需营养,增加红细胞生成;此外,沙棘中丰富的抗氧化剂一方面可直接清除自由基,减少脂质过氧化反应,另一方面可使谷胱甘肽氧化酶(GSH-Px)和红细胞超氧化物歧化酶(SOD)两种抗氧化酶活性提高,增强了红细胞抗氧化能力,延长红细胞的寿命^[1]。

正常的DBA/2小鼠灌服沙棘油后白细胞数无明显升高。SCID小鼠灌服沙棘油后其白细胞数明

显上升,与灌胃前相比具有明显差异。SCID 小鼠是一种先天性淋巴细胞免疫缺陷动物,纯合的 SCID 基因特异性地阻碍了 T 和 B 淋巴细胞分化成特异性功能淋巴细胞,动物缺乏功能性的 T 和 B 淋巴细胞,外周血中白细胞减少。但其它细胞不受 SCID 基因的影响,巨噬细胞、粒细胞、巨核细胞及红细胞生成正常。本实验提示沙棘油不会刺激正常小鼠粒系造血功能,在外周血白细胞降低的情况下,沙棘油能通过调节细胞因子如 IL-2 或 IL-3 的分泌及靶细胞对细胞因子的敏感性,刺激淋巴细胞分化及骨髓粒系造血功能,升高外周血液中白细胞数,是一个安全的调节造血功能的药物。

注射 5-氟尿嘧啶 4~5 天后小鼠进入骨髓抑制期,陆续死亡,但沙棘组死亡率明显低于阴性对照组,与 G-CSF 组死亡率接近。故认为沙棘对 5-氟尿

嘧啶产生的毒性反应有保护作用,能提高化疗后小鼠的生存率。此外,化疗后小鼠的肝脏病理组织学检查可见沙棘油组肝细胞仅呈散在点状坏死,表明沙棘油能减轻 5-FU 对小鼠肝脏的毒性作用,减少肝细胞破坏,其机制可能与沙棘的抗氧化作用有关。

注:本文为广东省科技厅、卫生厅社会发展协作攻关项目(2002B30202)及广州市科技局基金项目(2001-Z-043-01-3)

参 考 文 献

- 1 刘天浩,等. 沙棘对血液系统的药用价值. 中药材, 2001, 24(8): 610
- 2 苗明三,等. 沙棘. 见:苗明三,主编. 法定中药药理与临床. 西安:世界图书出版公司,1998: 619~625
(2002-04-23 收稿)

The Study on the Effects of the Oil from *Hippophae rhamnoides* in Hematopoiesis

Chen Yunxian¹, Zhong Xueyun², Liu Tianhao³, Ge Zhihong⁴

(1. The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080; 2. Jinan University, Guangzhou 510630; 3. The Affiliated Sun Yat-sen Commemoration Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120; 4. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120)

Abstract Objective: To investigate the possibility of the oil from *Hippophae rhamnoides* (OHR) in supporting the hematopoietic reconstitution after high dose chemotherapy. Method: The mice were fed with OHR and variation of blood cell counts of the mice was recorded. Animal models of myelosuppression were built by 5-Fu intra-peritoneal infusion. The effects of OHR in the hematopoietic reconstitution were observed. Results: The counts of erythrocytes of OHR group were significantly elevated. The blood cell counts in myelosuppression mice fed with OHR exceeded those in control group, and the mortality was decreased. Conclusion: OHR can improve the hematopoiesis of erythroid lineage. Like G-CSF, OHR can stimulate the recovery of hematopoiesis after chemotherapy.

Key words *Hippophae rhamnoides*; Chemotherapy; Hematopoietic reconstitution

首杞补肾口服液对小鼠免疫功能的影响

周茂文 姚艳辉 肖鸿敏

(广州福寿仙药业有限公司,广州 510470)

摘要 目的:观察首杞补肾口服液对小鼠免疫功能的影响。方法:观察首杞补肾口服液对醋酸氢化考的松所致免疫抑制小鼠脾脏淋巴细胞转化、自然杀伤(NK)细胞活性、产生溶血素能力的影响以及对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响。结果:首杞补肾口服液对醋酸氢化考的松所致免疫抑制小鼠脾脏淋巴细胞转化有明显的纠正作用,使 NK 细胞活性恢复更为显著,产生溶血素的能力明显提高,以及可使低下的吞噬功能明显恢复。结论:首杞补肾口服液对免疫抑制模型(醋酸氢化考的松或环磷酰胺所诱导)小鼠的细胞免疫(淋巴细胞转化、NK 细胞活性)、体液免疫(溶血素)和非特异性免疫(巨噬细胞吞噬实验)等功能有明显的治疗作用,说明首杞补肾口服液对免疫功能低下有显著的调节作用,能够增强机体的抵抗力。

关键词 首杞补肾口服液 脾脏淋巴细胞 NK 细胞活性 溶血素 巨噬细胞 免疫功能

首杞补肾口服液由制首乌、枸杞子、山楂、银耳、蚕蛹等多味药材组成,具有滋补肝肾功能,适用于肝肾不足引起的头晕耳眩、烦躁易怒、口干咽燥、五心

烦热、盗汗、肢体麻木等症。本文对其免疫调节功能进行了一系列的实验研究。

1 实验材料