

胞的凋亡^[5]。本研究发现脂联素可以时间依赖性的增加高糖环境下心肌细胞 T-钙黏蛋白的表达,可能与氧化应激时 T-钙黏蛋白上调性表达有关,通过与脂联素结合后激活磷脂酰肌醇-3-激酶信号途径从而对抗氧化应激导致的细胞凋亡,并且可以提高细胞在氧化应激状态下的生存能力^[6]。说明脂联素可以通过上调受体 T-钙黏蛋白的表达发挥对心肌细胞的保护作用,且这种保护作用呈时间依赖性,从而为临床治疗糖尿病心肌病提供新的思路。

参考文献

- 1 Lu cai, Wei Li. Hyperglycemia - Induced Apoptosis in Mouse Myocardium[J]. Diabetes, 2002, 51: 1938 - 1948
- 2 Tsujino, Takeshi, Kawasaki, *et al.* Left ventricular diastolic dysfunction in diabetic patients: pathophysiology and therapeutic implications[J]. American Journal of Cardiovascular Drugs, 2006, 6(4): 219 - 230

- 3 Hug C, Wang J, Ahmad NS, *et al.* T - cadherin is a receptor for hexameric and high - molecular - weight forms of Acrp 30 / adiponectin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (28): 10308 - 10313
- 4 Bromhead C, Miller J H, McDonald F J. Regulation of T - cadherin by hormones, glucocorticoid and EGF [J]. Gene, 2006, 374: 58 - 67
- 5 Motoshima H, Wu X, Mahadev K, *et al.* Adiponectin suppresses proliferation a superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated oxidized LDL[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315: 264 - 271
- 6 Manjunath B. Joshi, Maria Philippova, Danila Ivanov, *et al.* T - cadherin protects endothelial cells from oxidative stress induced apoptosis [J]. FASEB, 2005, 10: 1096 - 1119
- 7 田腊梅, 李兴. 脂联素及 T-钙黏蛋白与大鼠糖尿病心肌病的关系 [J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(8): 505 - 506

(收稿: 2010 - 01 - 18)

(修回: 2010 - 04 - 07)

叶绿素铜钠联合三黄三仙汤治疗免疫介导再生障碍性贫血的动物实验研究

蒋慧芳 魏克民 王 勇

摘 要 目的 探讨叶绿素铜钠联合三黄三仙汤(YST)对再生障碍性贫血的治疗作用及机制。**方法** 动物实验研究:建立免疫介导再生障碍性贫血(AA)小鼠模型,随机分为空白对照组、模型对照组、CsA 对照组、叶绿素铜钠盐组、叶绿素铜钠联合三黄三仙汤(YST)组,每组 10 只,2 周后处死检测血象、骨髓像、骨髓病理切片、外周血 CD4⁺、CD8⁺、TNF- α 、IL-6 含量。**结果** YST能延长模型小鼠生存,降低模型小鼠的死亡率;改善模型小鼠的外周血红细胞,白细胞及血小板;提高骨髓有核细胞数;改善骨髓病理改变;降低外周血 CD8⁺细胞,增加 CD4⁺细胞比率,提高 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值;降低血 TNF- α 、IL-6 水平;与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** YST 对 AA 模型小鼠有较好的治疗作用。

关键词 叶绿素铜钠盐 贫血 再生障碍性 治疗 IL-6 TNF- α

Animal Research of Immune - mediated Aplastic Anemia Treatment by YST. Jiang Huifang, Wei Kemin, Wang Yong. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 310012, China

Abstract Objective To investigate therapeutic effect of YST in aplastic anemia and its mechanism. **Methods** Sixty immune - mediated aplastic anemia (AA) mice were established and then divided into five groups: normal control group, model control group, CsA control group, sodium copper chlorophyll group, YST group. After being treated 2 weeks, they were put to death and the hem gram, bone marrow, as well as bone marrow biopsy, CD4⁺, and CD8⁺, in peripheral blood, TNF- α and IL-6 were detected. **Results** YST can extend the survival period of the mice and reduce the mortality rate. The possibly mechanism may be the following: improving the model mice peripheral blood erythrocytes, leukocytes and platelets; increasing the nucleated cells and pathological changes of bone marrow; and at the cellular level, reducing the peripheral blood CD8⁺ cells and increasing the ratio of CD4⁺ cells, thus improving T cell ratio of CD4⁺/CD8⁺; possible decreasing serum TNF- α and IL-6 levels. It is significant different and $P < 0.05$. **Conclusion** YST has an effective effect on aplastic anemia mice.

Key words Sodium copper chlorophyll; Aplastic; Anemia; Therapy; IL-6; TNF- α

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(Y2008CA024)

作者单位:310012 杭州,浙江省立同德医院(蒋慧芳、魏克民);浙江中医药大学(王勇)

再生障碍性贫血(AA)是由于生物、化学、物理等因素引起的造血干细胞异常、骨髓微环境损伤、免疫缺陷导致红骨髓总容量减少,骨髓中无恶性细胞浸润,无广泛网硬红蛋白纤维增生,临床上以全血细胞减少为特征的一组综合征。近年来,我们采用叶绿素铜钠联合三黄三仙汤(YST)治疗AA患者,取得了较好的疗效,现将动物实验报告如下^[1]。

材料与方法

- 1. 动物和药物: Balb/c 小鼠, 8 ~ 12 周龄, 体重 16 ~ 20g, 雌雄不限, 作为受体; DBA/2 小鼠, 8 ~ 10 周龄, 雌雄不限, 作为供体。叶绿素铜钠, 配合魏克民教授经验方“三黄三仙汤”(黄芪 30g、黄精 15g、黄芩 15g、仙鹤草 30g、仙灵脾 20g、仙茅 20g) 研制成 YST。临用前把 YST 分别配成 10mg/ml 的溶液, 叶绿素铜钠配成(3mg/ml)溶液。环孢菌素胶囊, 10 毫克/粒, No vartis Pharma Gmbh 生产, 配成 1mg/ml 溶液。
- 2. 免疫介导 AA 小鼠模型的建立: 根据周永明方法^[2], 制成单细胞悬液 5×10^6 /ml 浓度, 每只再障动物模型注射 0.2ml, 而对正常对照组静脉输入无菌生理盐水(NS)0.2ml。
- 3. 分组与给药: 50 只小鼠随机分为空白对照组、模型对照

组、CsA 对照组、叶绿素铜钠组、YST 组, 每组 10 只, 雌雄各半。空白对照组(NS), 模型对照组(NS), CsA 对照组(环孢菌素 25mg/kg), 叶绿素铜钠组(25mg/kg), YST 组(50mg/kg)。每天均予灌胃给药 0.25ml, 连续 2 周。

4. 指标检测方法: 外周血象检测, 骨髓病理切片, 细胞因子(外周血 TNF - α 、IL - 6), 流式细胞仪检测外周血液 CD4⁺、CD8⁺。

5. 统计学方法: 计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS11.5 for windows 统计软件, 各处理组之间比较用单因素方差分析, 组间多重比较用 LSD 方法, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

结 果

1. 血象检测: 模型对照组小鼠的外周血白细胞数明显小于其余 4 组, $P < 0.01$ 。模型对照组小鼠的外周血红蛋白(HB)明显小于其余 6 组, $P < 0.05$; YST 组的外周血红蛋白明显多于叶绿素组, $P < 0.01$ 。模型对照组小鼠的外周血小板数明显小于其余 4 组, $P < 0.01$; YST 组的外周血小板数明显多于叶绿素组, $P < 0.05$ (表 1)。

表 1 AA 模型小鼠造模后各组外周血白细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	白细胞($\times 10^9$ /L)	HB(g/L)	血小板计数($\times 10^9$ /L)
YST 组	10	3.14 $\pm$ 1.56 ^{▲▲*}	125.33 $\pm$ 17.81 ^{▲▲*##}	476.00 $\pm$ 369.11 ^{▲▲*#}
CsA 组	10	3.98 $\pm$ 0.67 ^{▲▲*}	129.50 $\pm$ 22.65 ^{▲▲*}	567.00 $\pm$ 106.29 ^{▲▲}
叶绿素组	10	2.39 $\pm$ 0.56 ^{▲▲*}	106.00 $\pm$ 4.55 ^{▲*}	259.90 $\pm$ 53.00 ^{▲*}
模型对照组	10	0.76 $\pm$ 0.32 [*]	89.57 $\pm$ 5.26 [*]	28.71 $\pm$ 11.93 [*]
空白对照组	10	9.09 $\pm$ 2.92 ^{▲▲}	167.00 $\pm$ 8.79 ^{▲▲}	707.22 $\pm$ 109.77 ^{▲▲}

各组与模型对照组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; 各组与空白对照组比较, ^{*} $P < 0.01$; YST 与叶绿素组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

2. 骨髓病理切片: 见图 1 ~ 图 5。

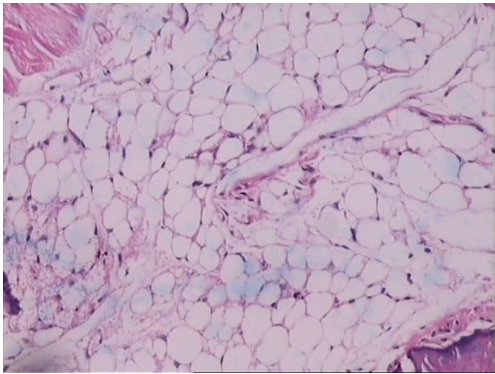


图 1 模型对照组: 增生极度低下骨髓片
H1 染色($\times 100$ 倍)

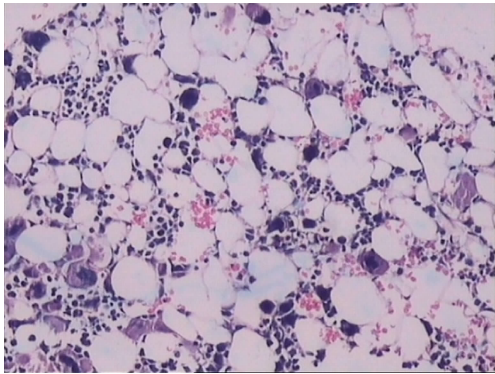


图 2 叶绿素铜钠组: 增生低下骨髓片
H1 染色($\times 100$ 倍)

3. 细胞因子的检测: 模型对照组小鼠的外周血 TNF - α 明显高于其余 4 组, $P < 0.01$; YST 组的外周

血 TNF - α 明显低于叶绿素组, $P < 0.01$ 。模型对照组小鼠的外周血 IL - 6 明显高于其余 4 组, $P < 0.01$; YST 组的外周血 IL - 6 明显低于叶绿素组, $P < 0.01$,

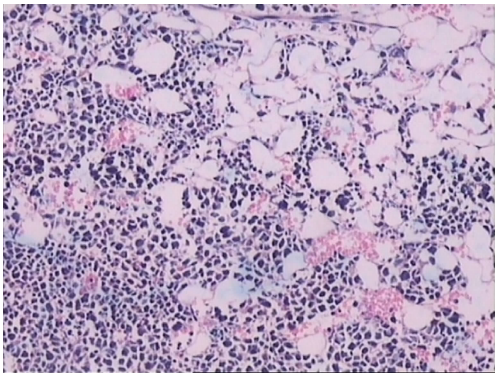


图3 CsA 对照组:增生活跃骨髓片
H1 染色(×100 倍)

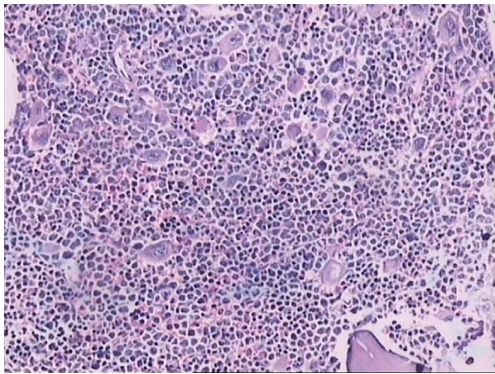


图5 空白对照组:增生极度活跃骨髓片
H1 染色(×100 倍)

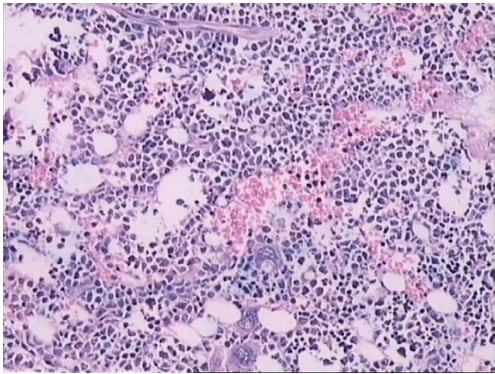


图4 YST 组:增生十分活跃骨髓片
H1 染色(×100 倍)

见表2。

4. 流式细胞仪检测:检测小鼠外周血液 CD4⁺, CD8⁺, 计算 CD4⁺/CD8⁺。模型对照组小鼠的外周血 CD4⁺ 明显小于其余4组, $P < 0.01$; YST 组的外周血

表2 AA 模型小鼠造模后各组外周 TNF- α 、IL-6 比较($\bar{x} \pm s$, 单位: pg/ml)

分组	n	TNF- α	IL-6
YST 组	10	114.68 $\pm$ 9.22 ^{▲*#Δ}	116.09 $\pm$ 13.23 ^{▲*#Δ}
CsA 组	10	78.74 $\pm$ 4.55 ^{▲*}	84.64 $\pm$ 4.23 ^{▲*}
叶绿素组	10	158.23 $\pm$ 14.10 ^{▲*}	137.70 $\pm$ 17.75 ^{▲*}
模型对照组	10	213.96 $\pm$ 25.01 [*]	172.49 $\pm$ 22.88 [*]
空白对照组	10	46.92 $\pm$ 9.73 [▲]	76.76 $\pm$ 6.28 [▲]

各组与模型对照组比较: [▲] $P < 0.01$; 各组与空白对照组比较: ^{*} $P < 0.01$; YST 与叶绿素组比较: [#] $P < 0.01$; YST 与 CsA 组比较: ^{Δ} $P < 0.01$

CD4⁺ 明显大于叶绿素组, $P < 0.01$ 。模型对照组小鼠的外周血 CD8⁺ 明显大于其余4组, $P < 0.01$; YST 明显小于叶绿素组, $P < 0.05$ 。模型对照组小鼠的外周血 CD4⁺/CD8⁺ 明显小于其余4组, $P < 0.01$; YST 组的外周血 CD4⁺/CD8⁺ 明显大于叶绿素组, $P < 0.01$ (表3)。

表3 AA 模型小鼠造模后各组外周血 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
YST 组	10	73.41 $\pm$ 6.53 ^{▲*#}	19.93 $\pm$ 5.29 ^{▲*#}	4.05 $\pm$ 1.57 ^{▲*#}
CsA 组	10	67.85 $\pm$ 6.57 ^{▲*}	22.13 $\pm$ 6.14 ^{▲*}	3.33 $\pm$ 1.18 ^{▲*}
叶绿素组	10	60.68 $\pm$ 7.40 ^{▲*}	27.74 $\pm$ 5.45 ^{▲*}	2.29 $\pm$ 0.65 ^{▲*}
模型对照组	10	34.88 $\pm$ 2.37 [*]	44.41 $\pm$ 5.97 [*]	0.80 $\pm$ 0.14 [*]
空白对照组	10	90.57 $\pm$ 3.28 [▲]	12.20 $\pm$ 1.57 [▲]	7.53 $\pm$ 0.95 [▲]

各组与模型对照组比较, [▲] $P < 0.01$; 各组与空白对照组比较, ^{*} $P < 0.01$; YST 与叶绿素组比较, [#] $P < 0.01$

讨 论

AA 的发病机制研究表明免疫功能的紊乱是重要的病理变化。从实验结果分析:模型组小鼠外周血三系(白细胞,血小板,红细胞及血红蛋白)减少明显,骨髓有核细胞数,骨髓造血组织容量明显降低,脂肪组织增多,与正常组小鼠有非常显著性差异,与文

献报道相符^[3]。AA 患者骨髓中活化的 T 淋巴细胞比例(HLA-DR⁺CD8⁺)显著增大,经免疫抑制治疗缓解后,患者骨髓中此细胞比例虽有降低,但还是高于正常水平,这种异常 T 细胞克隆能识别并杀伤具有该抗原表达的 CD34⁺ 细胞,从而导致骨髓衰竭;造血负调控因子(TNF- α , IFN- γ)能刺激正常 CD34⁺

细胞中 Fas 抗原表达,通过与其配体或特异性单克隆抗体结合,从而诱导细胞的程序性死亡-凋亡^[4]。这充分证实 T 淋巴细胞亚群存在着异常分布,参与 AA 的免疫发病机制。有应用定量免疫组化对 AA 患者骨髓活检细胞进行分析^[5],发现 8 例中的 5 例骨髓残余造血组织中的 T 细胞明显增多。本研究模型组小鼠外周血 CD4⁺ 细胞减少,CD8⁺ 细胞升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值下降甚至倒置,提示 AA 时外周血中 T 细胞亚群失调 CD4⁺ 细胞减少,CD8⁺ 细胞升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值下降或倒置。异常增高的 CD8⁺ 细胞抑制骨髓造血功能,分泌造血负调控因子,激活的 CD8⁺ 细胞及其分泌的 IFN- α ,TNF- γ 等细胞因子可以直接诱发造血干细胞的凋亡^[5]。

IL-6 是具有多种功能的造血调控因子,主要用于早、中期造血干/祖细胞的增生和分化,IL-6 又是 T、B 淋巴细胞增生、分化以及活化的重要调节因子。造血因子 IL-6 代谢紊乱是 AA 病理的一个重要环节^[6]。AA 患者 IL-6 水平提高可能是机体由于造血功能低下,代偿性分泌增加以促进造血^[7]。IL-6 与 AA 患者外周血白细胞及 CD4⁺ 细胞呈负相关,提示 IL-6 变化可能与细胞免疫异常有关,反应细胞因子网络失调在 AA 发病中所起作用的复杂性。本研究也证实 AA 模型小鼠外周血 TNF- α 和 IL-6 明显上升,较正常小鼠组比较有显著性差异。中医无 AA 病名,根据病症属“血虚”、“虚劳”、“萎黄”等范畴,病机为肾阳虚、肾阴虚、肾阴阳两虚或急髓枯,治则为补肾养血,调和阴阳或清热解暑救髓。叶绿素铜钠盐为我院魏克民教授采用现代工艺技术,从蚕砂中提取叶绿素,再络合置铜(Cu²⁺)研制而成。其基本结构是由 4 个吡咯环组成的卟啉环,是一种良好的

造血细胞复合剂。动物实验证实叶绿素铜钠盐不但能升高 AA 小鼠的外周血三系,且对骨髓中多能干细胞、粒-单核祖细胞、红系祖细胞及骨髓有核细胞、骨髓基质细胞的修复均有很好的调节作用^[8]。YST 所用三黄三仙汤集温肾健脾,益气生血于一方。方中黄芪补气益脾生血;仙灵脾、仙茅、补骨脂温肾壮阳;黄精益气养阴,滋补脾肾;仙鹤草补虚止血;黄芩清热安血。近年现代药理学研究证实黄芪、补骨脂、仙茅、仙灵脾等均具刺激骨髓造血及提高机体免疫功能的作用。全方配伍得法,用药精当,共奏健脾补肾、益气生血、刺激骨髓造血之功效,配合蚕砂提取物叶绿素铜钠盐治疗 AA,确能收到较好疗效^[1]。叶绿素铜钠联合三黄三仙汤对 AA 模型小鼠有较好的治疗作用。

参考文献

- 1 蒋慧芳,魏克民.叶绿素铜钠联合三黄三仙汤治疗慢性再生障碍性贫血 33 例临床观察.中国中医药科技,2009,16(3):235
- 2 周永明,黄韬,薛志忠,等.免疫介导再生障碍性贫血的实验研究.中国实验血液学杂志,1998,6(1):59
- 3 王玲玲,周冬枝,刘永惠,等.生血丸 I 号对免疫介导的再生障碍性贫血小鼠骨髓增殖的影响.中国中医基础医学杂志,2002,8(5):53-54
- 4 Young NS,Scheinberg P,Calado RT. Aplastic anemia. Curr Opin Hematol,2008,15(3):162-168
- 5 Nakao S Immune mechanism of aplastic anemia[J]. Int J Hematol, 1997,66(2):127-134
- 6 张涛,孙秉中,冯琪,等.急性和慢性再生障碍性贫血患者 IL-4, IFN- γ 及 TNF- α 诱生水平的对比研究[J]. 中华血液学杂志, 2000,21(10):530-532
- 7 陈幸化.骨髓基质细胞在造血调控中的作用[J]. 国外医学(临床生物医学与检验学分册),2000,21(1):20
- 8 魏克民.叶绿素铜钠治疗再生障碍性贫血的实验研究[J],浙江医学,1989,11(4):193-195

(收稿:2010-01-15)

贝那普利对年轻自发性高血压大鼠左室心肌胶原的影响

孙绍贤 李海涛 刁增利 唐蕊 赵红 宋文静

摘要 目的 探讨贝那普利对年轻自发性高血压大鼠左室心肌间质及血管周围胶原影响及其机制。**方法** 16 只自发性高血压大鼠(SHR)投币法随机分为模型组($n=8$)、贝那普利治疗组($n=8$)。7 只 WKY 大鼠为正常血压大鼠组。治疗组给予贝

基金项目:河北省教育厅资助项目(2004120);河北省卫生厅资助项目(04263);华北煤炭医学院附属医院资助项目(08009)

作者单位:063000 唐山,华北煤炭医学院附属医院心内科(孙绍贤、李海涛、刁增利、唐蕊、赵红、宋文静);066000 河北省秦皇岛市妇幼保健院内科(孙绍贤);063000 河北省唐山工人医院分院心内科(唐蕊);053000 河北省衡水市第四人民医院心内科(宋文静)

通讯作者:李海涛,电子信箱:lihaitao@126.com