

益髓方对环磷酰胺致血小板计数减少模型小鼠的影响

姚 靓 宋延平 陈信义 田劭丹

摘 要 **目的** 观察医院制剂益髓方对环磷酰胺致血小板计数减少模型小鼠的影响。**方法** 将 72 只健康 KM 小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、益血生胶囊对照组与益髓方大、中、小剂量组。分别予腹腔注射环磷酰胺,制备血小板减少症小鼠模型,观察益髓方大、中、小剂量对模型小鼠外周血小板计数的影响。**结果** 与模型对照组比较,益髓方大、中、小剂量组小鼠外周血小板计数均明显提升($P < 0.05$)。与模型对照组比较,益血生胶囊对照组小鼠外周血白细胞计数明显升高($P < 0.05$),益髓方各剂量组白细胞计数变化不明显。与正常对照组比较,用药各组小鼠骨髓增殖程度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 益髓方大、中、小剂量组对环磷酰胺致血小板计数减少有治疗作用,且可能有降低化疗致骨髓损伤作用,益血生胶囊对环磷酰胺致白细胞计数减少有治疗作用,均值得进一步深入研究并推广应用。

关键词 益髓方 环磷酰胺 血小板减少

中图分类号 R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.07.007

Effect of Yisui Recipe on Cyclophosphamide – induced Thrombocytopenia in Model Mice. YAO Liang, SONG Yanping, CHEN Xinyi, et al. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Abstract **Objective** To observe the effect of hospital preparation Yisui Recipe on cyclophosphamide – induced thrombocytopenia in model mice. **Methods** 72 healthy KM mice were randomly divided into 6 groups: normal control, model control, Yixuesheng Capsule control and Yisui Recipe large, medium and low dose groups. Cyclophosphamide was injected intraperitoneally to prepare a mouse model of thrombocytopenia, and the effect of large, medium and small doses of Yisui Recipe on the peripheral blood platelet count of the model mice was observed. **Results** Compared with the model control group, the peripheral blood platelet counts of the mice in the large, medium and low dose groups of Yisui Recipe increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the peripheral blood white blood cell count of mice in the Yixuesheng Capsule control group was significantly increased ($P < 0.05$), while the white blood cell count of each dose group of Yisui Recipe did not change significantly. Compared with the normal control group, there was no significant difference in the degree of bone marrow proliferation among the treatment groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The large, medium and small dose groups of Yisui Recipe have a therapeutic effect on cyclophosphamide – induced thrombocytopenia, and may reduce bone marrow damage caused by chemotherapy. Yixuesheng Capsule has a therapeutic effect on cyclophosphamide – induced leukopenia, and they are both worthy of further in – depth research and popularization and application.

Key words Yisui Recipe; Cyclophosphamide; Thrombocytopenia

血小板减少症在临床中较为常见,血小板计数轻度减少时患者常无明显临床症状,血小板计数中度减少时可见出血现象,如皮肤紫癜、牙龈出血,口腔黏膜出血等。血小板计数重度减少时则可能出现脏器出血,特别是致命的颅内出血^[1]。导致血小板计数减少最常见的是血液系统疾病,其次是风湿免疫病、恶性肿瘤放化疗及其他药物相关性血小板减少症等^[2-7]。具有益气养阴活血功效的益髓方为北京中医药大学东直门医院院内制剂,已在临床应用近 30

年,对骨髓增生异常综合征低危患者外周血象具有明显改善效果^[8-10]。同时,通过长期临床应用观察,益髓方对血小板计数减少亦有较好提升效果^[11]。笔者所在课题组在承担国家“十一五重大新药创制科技专项”研究过程中,选取环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)致血小板计数减少小鼠模型为研究对象,采用不同剂量益髓方进行干预,观察模型小鼠外周血小板计数变化,以期将益髓方拓展应用于治疗血小板减少症提供客观依据。

材料与方法

1. 动物:KM 小鼠由西安交通大学医学院实验动物中心提供[合格证号:0001303,许可证号:SCXK(陕)2007-001],室温 20~24℃,相对湿度为 40%~

基金项目:国家科技重大专项(2010ZX09102-203)

作者单位:100700 北京中医药大学东直门医院(姚靓、陈信义、田劭丹);710003 西安,陕西省中医药研究院(宋延平)

通信作者:田劭丹,电子邮箱:oliviatsd@126.com

70%,光照 8h/d,排风扇通风 2 次/天,每次 1h,雌雄分笼饲养,自来水自由摄取,饲料为实验动物全价营养饲料,适应性观察 1 周后进行实验。

2. 药物与试剂:益髓方由陕西星华研究所按照中药新药研究工艺制备并提供。按照医院制剂成人每日 45g 成药处方量,体重按 60kg 计,服药量为 0.75g/kg 体重。阳性药物益血生胶囊,生产批号:110915,批准文号:国药准字 Z19983056,成人每粒 0.25g。口服,每次 4 粒,每日 3 次。体重按 60kg 计,服药量为 0.05g/kg 体重。浙江天杭生物科技有限公司生产的出生 2h 内的健康新生牛无支原体血清,质量级别:超级,装量:200ml,最终过滤孔径:0.1 μ m(生产批号:100701);瑞氏色素(批号:20100422)购自天津傲然精细化工研究所;甲醇(批号:110416)购自天津市富宇精细化工有限公司。

3. 仪器:电子天平(型号:BS210S),精确度 0.1mg,购自北京赛多利斯天平厂;XSZ-H 型彩色摄像机由北京杰伟世视音频设备有限公司组装。Exigo Vet 动物血细胞分析仪从瑞典 EXIGO 公司进口。

4. 造模:参照参考文献[12]方法,先取 16 只健康 KM 小鼠,雌雄各半,随机分为两组,模型组和正常对照组。模型组按体质量腹腔注射环磷酰胺注射液首剂量 200mg/kg,0.1ml/10g,1 次/天。次日起给予维持剂量 30mg/kg,0.1ml/10g,1 次/天,连续 6 天。正常对照组按体质量腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液,0.1ml/10g,1 次/天,连续 7 天。末次给药 24h 后,摘眼球取血,检测模型小鼠外周血血小板计数,进行 *t* 检验,当发现模型组外周血血小板计数明显低于正常对照组时($P < 0.05$),表明预实验成功,再按照此造模方法进行正式试验。

5. 分组:取健康 KM 小鼠 72 只,雌雄各半,体质量 18~22g,随机分为正常对照组、模型对照组、益血生胶囊对照组与益髓方大、中、小剂量组。

6. 给药:除正常对照组之外,其余各组小鼠按体质量腹腔注射环磷酰胺注射液首剂 200mg/kg,0.1ml/10g,1 次/天。次日起给予维持剂量 30mg/kg,0.1ml/10g,1 次/天,连续 6 天;正常对照组按体质量腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液 0.1ml/10g,1 次/天,连续 7 天。益髓方按临床每公斤体质量服药量 0.75g/kg,小鼠给药大、中、小剂量分别为 15g/kg、7.5g/kg、3.75g/kg,分别为临床拟用剂量的 20、10、5 倍;益血生剂量 1g/kg 为临床拟用剂量的 20 倍。于造模当天起,灌胃给药,1 次/天,连续 7 天。

7. 检测指标:末次给药后 24h,各组小鼠分别摘眼球采血,用动物血球计数仪检测各组小鼠外周血血小板(platelet,PLT)、白细胞(white blood cell,WBC)计数,并进行统计学处理。实验结束后处死小鼠,取股骨,除净软组织,用 6 号针头以 1ml 小牛血清冲出骨髓细胞,200 目筛网过滤制成单个骨髓细胞悬液。将单个骨髓细胞悬液以 1000r/min 离心 5min,去上清,洗涤 2 次,弃上清,小牛血清定容至 5ml。制备骨髓涂片,瑞氏染液染色。由陕西省中医学院药物研究所血液实验室专科实验师按白细胞计数法进行骨髓有核细胞计数,并进行评分。骨髓增生程度判定标准:①骨髓增生极度活跃:有核细胞占全部细胞(包括无核红细胞)的比例 $\geq 50\%$ 或有核细胞 ≥ 100 个,评 4 分;②骨髓增生明显活跃:有核细胞占全部细胞(包括无核红细胞)的比例 $> 10\%$ 且 $< 50\%$ 或有核细胞 > 50 个且 < 100 个,评 3 分;③骨髓增生活跃:有核细胞占全部细胞(包括无核红细胞)的比例 $\leq 10\%$ 且 $> 1\%$ 或有核细胞 > 10 个且 ≤ 50 个,评 2 分;④骨髓增生减低:有核细胞占全部细胞(包括无核红细胞)的比例 $\leq 1\%$ 或有核细胞 ≤ 10 个,评 1 分;⑤骨髓增生极度减低:有核细胞占全部细胞(包括无核红细胞)的比例 $\leq 0.5\%$ 或有核细胞 ≤ 5 个,评 0 分。

8. 统计学方法:白细胞计数、血小板计数采用 Excel 软件进行统计分析。骨髓增生程度采用 SPSS 16.0 统计学软件对数据进行统计分析。两组间比较用成组 *t* 检验,各项指标均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 对血小板计数的影响:实验各组小鼠外周血血小板计数检测结果详见表 1。与正常对照组比较,模型对照组小鼠外周血血小板计数明显减少($P < 0.01$)。与模型对照组比较,益髓方大、中、小剂量组小鼠外周血血小板计数明显提升($P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明益髓方各剂量均有治疗 CTX 致血小板减少作用。

表 1 实验各组小鼠外周血血小板计数检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量	动物数	血小板计数($\times 10^9/L$)
正常对照组	30ml/kg	12	729.3 $\pm$ 133.4
模型对照组	30ml/kg	12	469.0 $\pm$ 160.4 [*]
益血生胶囊对照组	1g/kg	12	566.0 $\pm$ 150.3
益髓方大剂量组	15g/kg	12	602.6 $\pm$ 148.1 [#]
益髓方中剂量组	7.5g/kg	12	649.7 $\pm$ 117.3 [#]
益髓方小剂量组	3.75g/kg	12	666.0 $\pm$ 220.4 ^{##}

与正常对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$,

^{##} $P < 0.01$

2. 对白细胞计数的影响:实验各组小鼠外周血白细胞计数检测结果详见表 2。与正常对照组比较,模型对照组、益血生胶囊对照组、益髓方各剂量组小鼠外周血白细胞计数均明显减少($P < 0.01$)。与模型对照组比较,益血生胶囊对照组小鼠外周血白细胞计数明显高于模型对照组($P < 0.05$);益髓方各剂量组小鼠外周血白细胞计数与模型对照组比较,差异无统计学意义。表明对照药益血生胶囊有治疗 CTX 致白细胞减少作用。

表 2 实验各组小鼠外周血白细胞计数检测结果($\bar{x} \pm s$)			
组别	给药剂量	动物数	白细胞计数($\times 10^9/L$)
正常对照组	30ml/kg	12	4.5 $\pm$ 1.1
模型对照组	30ml/kg	12	1.6 $\pm$ 1.1 *
益血生胶囊对照组	1g/kg	12	2.8 $\pm$ 1.6 #
益髓方大剂量组	15g/kg	12	1.7 $\pm$ 0.7
益髓方中剂量组	7.5g/kg	12	2.0 $\pm$ 1.0
益髓方小剂量组	3.75g/kg	12	1.5 $\pm$ 0.9

与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型对照组比较,# $P < 0.05$

3. 对骨髓增殖的影响:按照骨髓增殖程度分级标准,实验各组小鼠骨髓增殖程度检测结果详见表 3。与正常对照组比较,模型对照组小鼠骨髓增殖程度评分明显升高($P < 0.05$),可能与应用 CTX 后骨髓反应性增生有关。与正常对照组比较,用药各组小鼠骨髓增殖程度差异无统计学意义($P > 0.05$),表明应用益血生胶囊、益髓方各剂量干预后 CTX 模型小鼠没有发生显著骨髓抑制。

表 3 实验各组小鼠骨髓增殖程度检测结果($\bar{x} \pm s$)			
组别	给药剂量	动物数	骨髓增殖程度评分(分)
正常对照组	30ml/kg	12	2.3 $\pm$ 0.5
模型对照组	30ml/kg	12	3.1 $\pm$ 0.9 *
益血生胶囊对照组	1g/kg	12	2.3 $\pm$ 0.8
益髓方大剂量组	15g/kg	12	2.3 $\pm$ 0.7
益髓方中剂量组	7.5g/kg	12	2.6 $\pm$ 1.4
益髓方小剂量组	3.75g/kg	12	2.7 $\pm$ 1.1

与正常对照组比较,* $P < 0.05$

讨 论

CTX 属广谱抗肿瘤药物,常与其他抗肿瘤药物组成联合化疗方案,对各种类型的白血病和实体瘤均有治疗效果^[13]。CTX 作为免疫抑制剂,还可用于治疗各种自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肾病综合征、多发性肉芽肿、天疱疮以及溃疡性结肠炎、原发免疫性血小板减少症等,也是自体造

血干细胞移植的干细胞动员剂^[14~17]。CTX 在临床应用中可见不同类型及不同程度的不良反应,其中对骨髓造血的影响使其成为制备骨髓抑制动物模型的常用药物^[18,19]。

益髓方(原名益髓颗粒剂)由炙黄芪、党参、生地、熟地、菟丝子、丹参、龟板胶、阿胶、桃仁、红花、地龙、白花蛇舌草、鸡血藤、蜈蚣等组成。炙黄芪为治诸气虚之要药;阿胶擅补血、止血、滋阴润燥;两药合用可达益气养阴、补血生血之功效,在方中为君药。熟地可滋阴补血、益精填髓;丹参能活血调经、祛瘀止痛、凉血消痈、清心除烦、养血安神;鸡血藤能补血、活血、通络;三药合用既能补益肝肾、填精生髓,又能活血通络、祛瘀生新,辅助君药加强益气养阴、生血补血之效,在方中为臣药。党参能补中益气、生津养血;红花可活血化瘀;生地能清热凉血、养阴生津;龟甲胶可滋阴潜阳、补肾填精;诸药合用,即可强健脾胃,促进水谷精微吸收,化营为血,又可补益肝肾,滋阴养血,在方中为佐药。菟丝子功效补阳益阴,在诸多滋阴药中加入补阳药,取阳中求阴之意;又因肝肾同源,基于“肾主骨生髓”理论,取菟丝子能引诸药走五脏、入骨髓、调和气血阴阳之性,在方中为使药。综观全方诸药合用达“益气养阴(血)、活血通络、祛瘀生新”之功效^[20]。

益髓方原意用于骨髓增生异常综合征低危患者治疗,能够缓解或稳定患者外周血象,延缓急性白血病转化速度,降低转白率,并能够降低患者感染概率^[21,22]。在临床应用中,通过观察发现,益髓方对免疫性血小板减少症也具有较好疗效,有促进骨髓病态巨核细胞分化成熟等效果^[23]。因此,课题组通过本次研究拟探索益髓方对化疗所致血小板减少症的疗效。结果显示,与模型对照组比较,益髓方大、中、小剂量组小鼠外周血血小板计数均明显提升($P < 0.05$),表明益髓方各剂量组均对 CTX 致血小板计数减少有治疗作用。与模型对照组比较,益血生胶囊对照组小鼠外周血白细胞计数明显升高($P < 0.05$),而益髓方高、中、低剂量组比较差异无统计学意义,表明益髓方对 CTX 致白细胞计数减少治疗效果不明显。与正常对照组比较,模型对照组小鼠骨髓增殖程度评分明显升高($P < 0.05$),可能与应用 CTX 后骨髓应激反应有关,其结果与 CTX 联合粒细胞集落刺激因子能够动员骨髓造血干细胞一致,相关机制尚需要进一步研究。与正常对照组比较,用药各组小鼠骨髓增殖程度差异无统计学意义($P > 0.05$),表明应用益血

生胶囊、益髓方各剂量干预后 CTX 模型小鼠未发生显著骨髓抑制。

综上所述,益髓方大、中、小剂量组对 CTX 致血小板计数减少模型小鼠有治疗作用,且可能有降低化疗致骨髓损伤作用,为益髓方治疗化疗相关血小板减少症提供了实验依据。阳性对照药益血生胶囊对 CTX 致模型小鼠白细胞计数减少有治疗作用,值得临床推广应用。由于红细胞寿命较长,在本实验中没有观察到红细胞与血红蛋白减少情况,故未在文中列出。

参考文献

- 王德志. 血小板减少的原因及危害[J]. 特别健康, 2021, 20: 12
- 李昕雨, 何杨, 阮长耿. 原发免疫性血小板减少症的治疗进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2021, 29(3): 983 - 987
- 吴小乐, 刘欢乐, 郑周, 等. 血小板参数在鉴别诊断免疫性血小板减少症和再生障碍性贫血中的作用及其对疗效判断的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(4): 469 - 471, 483
- 秦伟, 李四强. 自身免疫性疾病介导的血小板减少机制研究进展[J]. 中国基层医药, 2019, 26(23): 2941 - 2944
- 卢平. 儿童系统性红斑狼疮合并血小板减少的机制研究和临床治疗进展[J]. 微循环学杂志, 2019, 29(3): 69 - 74
- 陈信义, 史哲新, 侯丽. 肿瘤化疗相关性血小板减少症中医药防治专家共识[J]. 北京中医药, 2021, 40(5): 451 - 455
- 吴芙蓉, 杨昭毅, 李民, 等. 42 例药源性血小板减少症的帕累托分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(2): 240 - 243
- 许亚梅, 姜苗, 陈信义. 益髓颗粒剂在现代难治血液病中的应用[J]. 中国医药学报, 2004, 19(4): 245 - 246
- 李蕊白, 董青, 吕鹏, 等. 益髓颗粒治疗低、中危 I 型骨髓增生异常综合征的临床试验方案设计特色与评价[J]. 中国医药导报, 2018, 15(28): 115 - 119
- 李蕊白, 潘一鸣, 吴洁雅, 等. 益髓颗粒对低危、中危 I 型骨髓增生异常综合征患者贫血及相关症状的改善作用[J]. 北京中医药, 2021, 40(5): 456 - 460

- 吴晓勇, 李冬云, 陈信义, 等. 益髓颗粒对免疫性血小板减少性紫癜模型小鼠细胞相关因子表达影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(6): 849 - 852
- 张擎, 彭红娟, 余晓彬, 等. 环磷酰胺诱发小鼠血小板减少症模型的建立及其血小板功能的测定[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(12): 1277 - 1279, 1282
- 王慧, 毋艳, 刘晓娟. 吡柔比星、长春新碱、环磷酰胺、泼尼松联合治疗复发与难治性急性淋巴细胞白血病的效果[J]. 临床医学, 2019, 39(11): 88 - 90
- 雷佳. 环磷酰胺冲击疗法治疗类风湿性关节炎的效果分析[J]. 当代医药论丛, 2020, 18(5): 155 - 156
- 杨岫岩, 尹培达, 高翔, 等. 系统性红斑狼疮环磷酰胺冲击治疗的最佳间期探讨[J]. 中华内科杂志, 1996, 35(4): 257 - 260
- 魏华, 许珂, 侯广慧, 等. 长春新碱和环磷酰胺周期序贯联合对慢性移植物抗宿主病狼疮样小鼠肾脏病变的疗效研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(11): 777 - 782
- 石远凯, 何小慧, 韩晓红, 等. 环磷酰胺或足叶乙甙联合粒细胞集落刺激因子动员自体外周血造血干细胞的对照研究[J]. 癌症, 2003, 22(12): 1311 - 1316
- 宁恺佳, 王雯丽, 谢芝丽, 等. 161 例注射用环磷酰胺不良反应/事件报告分析[J]. 中国药业, 2017, 26(17): 74 - 77
- 郑丹, 沙启明, 王剑青, 等. 去甲斑蝥素对环磷酰胺诱导的白细胞减少症模型大鼠骨髓造血功能的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(3): 826 - 831
- 李冬云, 马薇, 荣秀梅, 等. 益髓颗粒组方分析及应用研究[J]. 中外医疗, 2009, 28(8): 153 - 154
- 李洁, 陈信义, 李冬云, 等. 益髓颗粒的基础研究与临床应用[J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2012, 19(1): 55 - 56
- 李冬云, 陈信义. 益髓颗粒剂降低骨髓增生异常综合征感染率的临床研究[J]. 中国医药学报, 1998, 6: 27 - 30, 80
- 吴晓勇, 李冬云, 陈信义, 等. 益髓颗粒对 ITP 小鼠脾脏 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞及其相关因子影响的研究[J]. 当代医学, 2010, 16(14): 1 - 3

(收稿日期: 2021 - 11 - 04)

(修回日期: 2021 - 12 - 08)

(上接第 26 页)

- Masahiro Yanagawa, Masahiko Kusumoto, Takeshi Johkoh, *et al.* Radiologic - Pathologic correlation of solid portions on thin - section CT images in lung adenocarcinoma: a multicenter study[J]. Clin Lung Cancer, 2018, 19(3): e303 - e312
- Tsutani Y, Miyata Y, Nakayama H, *et al.* Appropriate sublobar resection choice for ground glass opacity dominant clinical stage IA lung adenocarcinoma. Wedge resection or segmentectomy [J]. Chest, 2014, 145(1): 66 - 71
- Suzuki S, Sakurai H, Yotsukura M, *et al.* Clinical features of ground glass opacity - dominant lung cancer exceeding 3.0 cm in the whole tumor size[J]. Ann Thorac Surg, 2018, 105(5): 1499 - 1506

- 苏雷, 支修益, 张毅, 等. 亚厘米肺结节的外科诊疗分析[J]. 中国微创外科杂志, 2017, 17(1): 11 - 14
- Kadota K, Nitadori J, Sima CS, *et al.* Tumor spread through air spaces is an important pattern of invasion and impacts the frequency and location of recurrences after limited resection for small stage I lung adenocarcinomas[J]. J Thorac Oncol, 2015, 10(5): 806 - 814
- Kuriyama K, Seto M, Kasugai T, *et al.* Ground - glass opacity on thin - section CT: value in differentiating sub - types of adenocarcinoma of the lung[J]. Am J Roentgenol, 1999, 173: 465 - 469

(收稿日期: 2021 - 12 - 28)

(修回日期: 2022 - 01 - 13)