

生血宁抗红细胞衰老及对再生障碍性贫血的治疗作用

李佳桓,林海红,杜钢军*

(河南大学药学院药物研究所,河南 开封 475004)

摘要 目的:观察生血宁抗红细胞衰老及对再生障碍性贫血的治疗作用。方法:体外氧化衰老和自然衰老评价生血宁的抗红细胞衰老作用,检测指标包括红细胞溶血率、Na-K-ATP 酶、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、红细胞膜渗透脆性、流动性及通透性、造血祖细胞集落生成。苯诱导的再生障碍性贫血模型观察生血宁对小鼠再生障碍性贫血的治疗作用,检测指标包括外周血红细胞(RBC)、网织红细胞(Ret)和血红蛋白(Hb)及血清铁、红细胞生成素(EPO)、干细胞因子(SCF)、MDA 和 SOD。结果:生血宁能提高红细胞膜 Na-K-ATP 酶活性,降低 MDA 含量、防止红细胞的自然老化和氧化老化,显著降低红细胞膜渗透脆性及通透性,提高红细胞膜流动性。此外生血宁能刺激 CFU-E、CFU-GM 和 CFU-F 造血祖细胞集落生成。在再生障碍性贫血小鼠模型中,生血宁(400、200、100 mg/kg)呈剂量依赖性增加红细胞,显著提高红细胞血红蛋白含量和小鼠网织红细胞数,增加血清干细胞因子 SCF、降低 MDA 含量。结论:生血宁有较强的抗红细胞衰老作用,对苯诱导的小鼠再生障碍性贫血有显著治疗效果。

关键词 生血宁;红细胞衰老;再生障碍性贫血;造血祖细胞

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1001-4454(2017)02-0438-06

DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2017.02.043

Therapeutic Action of Shengxuening on Erythrocyte Aging and Aplastic Anemia

LI Jia-huan, LIN Hai-hong, DU Gang-jun

(Institute of Pharmacy, Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract Objective: To study therapeutic action of Shengxuening on erythrocyte aging and aplastic anemia. Methods: The anti-aging effect of Shengxuening on erythrocytes was evaluated by erythrocyte oxidative aging and natural aging *in vitro*, the index included erythrocyte hemolysis rate, Na-K-ATP enzyme, SOD and MDA, red cell membrane osmotic fragility, mobility and permeability and hematopoietic progenitor cell colony formation were measured. The aplastic anemia models induced by benzene was used to observe the therapeutic action of Shengxuening on aplastic anemia in mice, the index included peripheral blood RBC, Ret and Hb, serum levels of iron, EPO, SCF, MDA and SOD were measured. Results: Shengxuening could prevent natural aging and oxidative aging in erythrocytes by increasing Na-K-ATP enzyme activity and decreased the content of MDA. Shengxuening could reduce the cell membrane fragility and permeability, and increase the membrane fluidity in erythrocytes. In addition, Shengxuening significantly stimulated hematopoietic progenitor cell colony formation, such as CFU-E, CFU-GM and CFU-F. In the aplastic anemia model, Shengxuening(400, 200, 100 mg/kg) increased RBC in a dose-dependent manner, and markedly increased Hb content and Ret. Shengxuening significantly increased serum SCF and decreased serum MDA content. Conclusion: Shengxuening shows a stronger anti-aging effect on erythrocytes, and has also significant therapeutic action on aplastic anemia in mice.

Key words Shengxuening; Erythrocyte aging; Aplastic anemia; Hematopoietic progenitor cells

生血宁片即中药蚕砂提取物,为国家中药 II 类新药,主要成分为铁叶绿酸钠和叶绿素衍生物,铁叶绿酸钠与人体血红素结构及生理功能极其类似,能有效补充铁元素。叶绿素衍生物还能刺激骨髓造血、促进生血^[1]。生血宁片现已广泛应用于缺铁性贫血的临床治疗,疗效确切且无明显不良反应,能明显改善缺铁性贫血气血两虚证候评分^[2,3]。近年来不断有临床报道显示,生血宁在再生障碍性贫血治疗方面也取得一定疗效^[4,5],本研究旨在对生血宁

进行再生障碍性贫血药效学评价,考虑到再生障碍性贫血是红细胞衰老过度使造血干细胞耗竭导致的造血障碍^[6],本研究从生血宁抗红细胞衰老方面观察其对再生障碍性贫血的治疗作用,为其临床应用提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SPF 级 10 周龄雌性 KM 小鼠,体质量 18~22 g,购自河南省医学实验动物中心。实验动物生产许可证号:SCXK(豫)2010-0001。在恒

收稿日期:2016-08-27

基金项目:河南大学省部共建项目(SBGJ090704);河南省高校青年骨干教师项目(2010GGJS-025);河南省科技厅重点攻关项目(112101310308)

作者简介:李佳桓(1985-),女,硕士,助教,主要从事中药药理学研究;E-mail:jiahuan1020@126.com。

*通讯作者:杜钢军,E-mail:dgj1hh@163.com。

温 21~23 ℃、恒湿 45%~65%、各 12 h 明暗周期的饲养室,用全价颗粒饲料喂养,自由进食和饮水。动物实验操作程序均符合国家科委颁布的《实验动物管理条例》。

1.2 药物与试剂 生血宁片,武汉联合药业有限责任公司,批号:20140101,0.25 g/片,含蚕砂提取物 0.05 g,用 0.5% CMC-Na 制成相应浓度的混悬液用于体内实验;生血宁片原料药蚕砂提取物:含铁叶绿酸钠 23.4%,叶绿素衍生物不低于 60%,实验前制成相应浓度的生理盐水溶液用于体外实验;氯化血红素,天津海美欣科技有限公司,批号:140105;苯,天津市富宇精细化工有限公司;网织红细胞染液,北京雷根生物技术有限公司;荧光标记 CD34 抗体,武汉三鹰公司;肝素钠,万邦医药公司;H₂O₂ 溶液,无锡市苏强化工有限公司;IMDM 培养基,Gibco 公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程材料研究所; β -巯基乙醇、淋巴细胞分离液,购自北京索来宝科技有限公司;BCA 蛋白浓度试剂盒,武汉博士德生物工程公司;青、链霉素,华北制药集团公司;L-谷氨酰胺、1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH),美国 Sigma 公司;红细胞生成素(EPO),美国 AMGEN 公司;琼脂,上海生工生物工程有限公司;红细胞稀释液、血红蛋白试剂盒、MDA、SOD、EPO、Na-K-ATP 酶试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 主要仪器 UV-2100 型紫外分光光度仪,尤尼柯上海仪器有限公司;800 型酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;LGR16-W 高速冷冻离心机,北京京立离心机有限公司;XDS-500D 倒置显微镜,上海蔡康光学仪器有限公司;UV-2100 紫外分光光度仪,上海尤尼柯仪器有限公司;RF540 荧光分光光度计,日本岛津仪器公司。

2 方法

2.1 生血宁对红细胞衰老的影响

2.1.1 生血宁对红细胞氧化衰老的影响:昆明小鼠眼球取血,以 4% 柠檬酸钠作抗凝剂,加入 2~3 倍的生理盐水悬浮。于 4 ℃、1 000 r/min 离心 10 min,重复离心洗涤 3 次。用生理盐水制备 1% 的红细胞悬液。取 0.5 mL 红细胞悬液,分别加入 100 mmol/L H₂O₂,并加入 0.1 mL 生血宁(蚕砂提取物 1、2.5、10、20 μ g/mL)或氯化血红素 2 μ g/mL,对照加等体积生理盐水,37 ℃ 孵育 2 h,加 5 倍量生理盐水稀释,2 000 r/min 离心 6 min,上清液于 415 nm 测光密度,光密度值越大表明衰老损伤越严重。

2.1.2 生血宁对红细胞自然衰老的影响:红细胞悬液的制备同“2.1.1”项下,以 4.8 mL 红细胞悬液,

加药方法同“2.1.1”项下,于 37 ℃ 孵育 12、24、36、48 h。3 000 r/min 离心 10 min,取上清于 540 nm 测光密度,光密度值越大表明衰老越快。

2.1.3 红细胞 SOD 活性和 MDA 含量测定:药物孵育后的红细胞悬液 3 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,反复洗涤 3 次,采用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度,用于红细胞 SOD、MDA 水平结果计算,严格按试剂盒说明书操作方法进行测定。

2.1.4 红细胞膜 Na-K-ATP 酶活性检测:同“2.1.1”项下方法制备 2% 的小鼠红细胞悬液,以 9.8 mL 红细胞悬液,加药方法同“2.1.1”项下,于 37 ℃ 水浴 12 h,药物孵育后的红细胞悬液 3 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,反复洗涤 3 次。分别加入 30 倍体积预冷的 10 mmol/L Tris、0.25 mmol/L EDTA(pH 7.4)充分溶血 2 h,用高速低温离心机 12 000 r/min 离心 20 min,得白色红细胞悬液,用 BCA 法测定红细胞膜蛋白浓度并控制在 1.5~2.5 g/L,分装于一次性塑料管中,放 -4 ℃ 冰箱保存,整个过程在 0~4 ℃ 操作。之后严格按照试剂盒说明书操作测定红细胞膜 Na-K-ATP 酶活性。

2.2 生血宁对红细胞膜功能的影响

2.2.1 红细胞膜渗透脆性研究:生理盐水制备 2% 的正常小鼠红细胞悬液,取红细胞悬液 1.8 mL,加入 200 μ L 不同浓度的生血宁(蚕砂提取物 5、10、20 μ g/mL)或氯化血红素 2 μ g/mL,对照加等体积生理盐水。37 ℃ 作用 30 min,离心去上清液,用生理盐水洗涤 2 次,2 mL 生理盐水悬浮红细胞。取悬浮液 0.1 mL,加入 5 mL 含不同浓度氯化钠的低渗溶液(去离子水配制,0.60%~0.38%,相邻浓度差 0.02%,共计 12 个盐水梯度),置 37 ℃ 孵育 4 h,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液 545 nm 测光密度。

2.2.2 红细胞膜通透性研究:生理盐水制备 2% 的正常小鼠红细胞悬液,取红细胞悬液 1.8 mL,加药方法同“2.2.1”项下,37 ℃ 作用 30 min,再加入 0.2 mL 浓度为 0.06 mol/L NaNO₂ 溶液(空白管不加)。在 0 ℃ 下作用 5 min,离心去上清液,用生理盐水洗 2 次后,加入蒸馏水到 2 mL,于 4 ℃ 溶血 1 h,分别于 590 nm 和 635 nm 测高铁血红蛋白(MetHb)吸收度 E 和 E_x,根据公式计算 MetHb 百分含量:MetHb%=(E_x-0.04E)/1.07E_x×100%

2.2.3 红细胞膜流动性研究:生理盐水制备 2% 正常小鼠红细胞悬液,取红细胞悬液 1.8 mL,加药方法同“2.2.1”项下,37 ℃ 作用 30 min,膜流动性按 shinitzky 方法测定^[7],以 DPH 为荧光探针,用

RF540 荧光分光光度计采用氙灯光源, 荧光激发波长为 362 nm, 发射波长为 432 nm, 在 25 °C 下分别测定与激发偏振光振动方向平行、垂直时的荧光偏振度 P_1 、 P_2 , 计算荧光偏振度 (P): $P = (P_1 - GP_2) / (P_1 + GP_2)$, 其中 G 为校正因子, 仪器自动校正。细胞膜的流动性 (LFU) 用 P 表示: $LFU = (0.5 - P) / P^2$ 。

2.3 生血宁对造血祖细胞集落生成的影响

2.3.1 骨髓造血细胞制备: 抽取骨髓液, 肝素钠抗凝, 稀释后以 $(1.077 \pm 0.002) / \text{cm}$ 铺在淋巴细胞分离液上, 1 500 r/min 离心 15 min, 吸取界面层有核细胞, 用 IMDM 液洗涤 2 次, 1 000 r/min 离心 10 min 后备用。

2.3.2 骨髓红系祖细胞 (CFU-E) 培养: 经淋巴细胞分离的有核细胞用含 35% 胎牛血清的 IMDM 培养基调细胞数 $2 \times 10^5 / \text{mL}$ (含青、链霉素各 100 U, L -谷氨酰胺 15 μL , EPO 1 U, 2-巯基乙醇 10 mmol/L, 甲基纤维素 0.9%) 置于 6 孔板中, 分别加入不同浓度的生血宁 (蚕砂提取物 0、5、10、20 $\mu\text{g} / \text{mL}$) 和 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 的 EPO, 于 37 °C 5% CO_2 培养箱中孵育 5 d 后计数。

2.3.3 骨髓粒-单系祖细胞 (CFU-GM) 培养: 经淋巴细胞分离的有核细胞用含 35% 胎牛血清的 IMDM 培养基调细胞数 $2 \times 10^5 / \text{mL}$ (含青、链霉素各 100 U, L -谷氨酰胺 15 μL , EPO 1U, 2-巯基乙醇 10 mmol/L, 肌浸液 10%, 3% 琼脂 70 μL) 置于 6 孔板中, 加药方法同“2.3.2”项下, 于 37 °C 5% CO_2 培养箱中孵育 9 d 后计数。

2.3.4 骨髓纤维祖细胞 (CFU-F) 培养: 经淋巴细胞分离的有核细胞用含 20% 胎牛血清的 IMDM 培养基调细胞数 $8 \times 10^6 / \text{mL}$ (含青、链霉素各 100 U, L -谷氨酰胺 15 μL) 置于 6 孔板中, 加药方法同“2.3.2”项下, 于 37 °C 5% CO_2 培养箱中孵育 12~14 d 后计数。集落计数方法: 取其平均值; CFU-E

>8 个细胞为 1 个集落; CFU-GM 和 CFU-F >40 个细胞为 1 个集落。

2.4 生血宁对苯诱导小鼠再生障碍性贫血的治疗作用

2.4.1 苯诱导小鼠再生障碍性贫血模型的建立及分组给药: 正常昆明小鼠 60 只, 随机分为正常对照组、模型组、氯化血红素 (20 mg/kg) 阳性对照组及生血宁高、中、低剂量组 (以片剂计 400、200、100 mg/kg), 每组 10 只。造模前 1 w 开始给药, 药物用 0.5% 的 CMC-Na 配成混悬液, 模型组和正常对照组给予等体积 0.5% CMC-Na, 1 次/d。造模采用 20% 的橄榄油苯溶液皮下注射小鼠 5 mL/kg 隔日造模, 造模 6 w。造模全程结束后 2 w 检测结果。

2.4.2 外周血象检测: 治疗全程结束后, 检查外周血红细胞计数 (RBC)、网织红细胞计数 (Ret)、血红蛋白 (Hb) 含量。

2.4.3 生化指标检测: 按照 ELISA 试剂盒说明书要求检测血清 EPO 和干细胞因子 (SCF), 按试剂盒说明书要求检测血清 MDA 和 SOD。

2.5 统计学处理 用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析, 两组间比较用 t 检验。

3 结果

3.1 生血宁对红细胞衰老的影响 结果如表 1、2 所示, 20、10、5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 生血宁能显著抑制 H_2O_2 所致的氧化衰老 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 生血宁在 12~48 h 均能显著抑制红细胞的自然老化 ($P < 0.01$)。

3.2 生血宁对红细胞 Na-K-ATP 酶、SOD、MDA 的影响 结果如表 3 所示, 与生理盐水组比较, 生血宁 20、10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 组 Na-K-ATP 酶活性显著升高, 生血宁 20、10、5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 组 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 生血宁对红细胞衰老的影响 [$D(\lambda), \bar{x} \pm s, n=3$]

组别	氧化老化	自然老化			
		12 h	24 h	36 h	48 h
生理盐水组	0.051 ± 0.009	0.247 ± 0.038	0.357 ± 0.023	0.928 ± 0.054	1.418 ± 0.072
H_2O_2 组	0.104 ± 0.011**	—	—	—	—
氯化血红素组	0.096 ± 0.010	0.189 ± 0.007	0.462 ± 0.122	0.895 ± 0.101	1.97 ± 0.063**
生血宁 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 组	0.048 ± 0.008*#	0.055 ± 0.005**	0.251 ± 0.002**	0.725 ± 0.049**	1.008 ± 0.127**
生血宁 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$	0.062 ± 0.003*#	0.092 ± 0.013**	0.271 ± 0.190	0.730 ± 0.078*	1.167 ± 0.161
生血宁 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 组	0.083 ± 0.006#	0.166 ± 0.012*	0.349 ± 0.049	0.808 ± 0.040*	1.344 ± 0.233
生血宁 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 组	0.088 ± 0.002	—	—	—	—
生血宁 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 组	0.091 ± 0.016	—	—	—	—

注: 与生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 H_2O_2 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表 2 生血宁对红细胞衰老溶血率的影响

组别	氧化老化	自然老化			
		12 h	24 h	36 h	48 h
生理盐水组	49.04	100	100	100	100
H ₂ O ₂ 组	100.00	—	—	—	—
氯化血红素组	92.31	76.51	129.41	96.44	138.92
生血宁 20 μg/mL 组	46.15	22.22	70.30	78.12	71.09
生血宁 10 μg/mL 组	59.61	37.36	75.91	78.66	82.30
生血宁 5 μg/mL 组	79.80	67.21	97.76	87.07	94.78
生血宁 2 μg/mL 组	84.62	—	—	—	—
生血宁 1 μg/mL 组	87.50	—	—	—	—

注:与生理盐水组比较,* P<0.05,** P<0.01;与 H₂O₂ 组比较,# P<0.05,## P<0.01

表 3 生血宁对红细胞 Na-K-ATP 酶、SOD、MDA 的影响 (x ± s, n = 3)

组别	Na-K-ATP 酶/(U/mL)	SOD/(U/mL)	MDA/(μmol/L)
生理盐水组	1.549 ± 0.139	2.999 ± 0.578	2.016 ± 0.339
氯化血红素组	1.098 ± 0.196*	2.277 ± 0.442	2.689 ± 0.243*
生血宁 20 μg/mL 组	2.203 ± 0.242*	2.353 ± 0.597	0.849 ± 0.262**
生血宁 10 μg/mL 组	2.088 ± 0.241*	3.192 ± 0.649	0.949 ± 0.277*
生血宁 5 μg/mL 组	1.400 ± 0.118	2.967 ± 0.565	1.033 ± 0.301*

注:与生理盐水组比较,* P<0.05,** P<0.01

3.3 生血宁对红细胞膜渗透脆性的影响 结果如表 4 所示 10、5 μg/mL 对红细胞膜渗透脆性无影响。

可见,氯化血红素增加了红细胞的渗透脆性,而生血宁 20 μg/mL 可降低其渗透脆性。

表 4 生血宁对红细胞膜渗透脆性的影响 (x ± s, n = 3)

NaCl 浓度	溶血率/%				
	生理盐水	氯化血红素 2 μg/mL 组	生血宁 20 μg/mL 组	生血宁 10 μg/mL 组	生血宁 5 μg/mL 组
0%	100	—	—	—	—
0.38%	98 ± 1.6	99 ± 2.4	96 ± 1.5	97 ± 1.8	98 ± 2.0
0.40%	97 ± 1.4	98 ± 1.3	94 ± 1.3	98 ± 1.7	98 ± 1.8
0.42%	94 ± 1.3	96 ± 1.2	90 ± 2.4	92 ± 2.2	94 ± 1.5
0.44%	67 ± 1.4	87 ± 2.8	79 ± 1.8	80 ± 1.8	75 ± 1.4
0.46%	46 ± 2.0	73 ± 1.9	58 ± 0.8	66 ± 2.1	60 ± 0.9
0.48%	30 ± 1.0	55 ± 1.4	25 ± 2.4	50 ± 1.4	43 ± 1.4
0.50%	9 ± 0.4	30 ± 0.9	15 ± 1.6	12 ± 0.7	11 ± 0.9
0.52%	7 ± 0.5	19 ± 0.2	12 ± 0.7	9 ± 0.2	8 ± 0.2
0.54%	2 ± 0.3	9 ± 1.5	6 ± 0.4	7 ± 0.6	2 ± 0.6
0.56%	2 ± 0.2	5 ± 0.6	4 ± 0.5	3 ± 0.5	2 ± 0.5
0.58%	1 ± 0.1	2 ± 0.7	3 ± 0.6	1 ± 0.4	1 ± 0.1
0.60%	1 ± 0.3	1 ± 0.1	1 ± 0.1	1 ± 0.2	1 ± 0.4
0.90%	0	—	—	—	—

注:溶血率 9% 以下,表明溶血程度很低;30%~70%,表明有部分溶血;85%~98%,表明几乎完全溶血

3.4 生血宁对红细胞膜流动性和通透性的影响 结果如表 5 所示,与生理盐水组比较,20、10、5 μg/mL 生血宁红细胞膜流动性显著升高 (P<0.05 或 P<0.01)。

鼠骨髓 CFU-GM、CFU-E 和 CFU-F 集落数均显著增多 (P<0.05 或 P<0.01)。

3.5 生血宁对造血祖细胞集落生成的影响 结果如表 6 所示,与生理盐水组比较,生血宁各剂量组小

3.6 生血宁对再生障碍性贫血小鼠外周血象的影响 结果如表 7 所示,与生理盐水组比较,除生血宁 200 mg/kg 组血红蛋白含量显著升高外,各给药组红细胞计数、网织红细胞计数及血红蛋白均显著降

低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 5 生血宁对红细胞膜流动性和通透性的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	流动性	通透性/%
生理盐水组	11.30±1.04	70.42%
氯化血红素组	12.54±1.78	88.69%
生血宁 20 μg/mL 组	18.38±2.01**	55.68%
生血宁 10 μg/mL 组	15.25±1.62*	36.32%
生血宁 5 μg/mL 组	14.31±1.14*	75.77%

注:与生理盐水组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 6 生血宁对造血祖细胞集落生成的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	CFU-E/(2×10^4)	CFU-GM/(1×10^5)	CFU-F/(1×10^5)
生理盐水组	19.34±2.38	16.97±2.08	8.07±1.09
氯化血红素组	20.86±2.42	17.85±2.29	9.33±2.18
生血宁 20 μg/mL 组	27.94±2.01**	22.43±1.09*	11.39±1.36*
生血宁 10 μg/mL 组	25.67±1.29*	21.77±1.02*	10.87±0.91*
生血宁 5 μg/mL 组	25.96±1.84*	21.65±0.49*	10.99±1.41*

注:与生理盐水组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 7 生血宁对小鼠红细胞、网织红细胞和血红蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	红细胞计数/($\times 10^{12}/L$)	网织红细胞计数/%	血红蛋白/(g/L)
正常对照组	2.53±0.22	4.327±0.011	147.22±10.26
模型组	1.39±0.43**	1.569±0.005**	110.34±7.28**
氯化血红素组	1.86±0.56#	2.963±0.009#	120.75±9.48#
生血宁 400 mg/kg 组	2.08±0.62##	3.190±0.003##	144.35±10.44##
生血宁 200 mg/kg 组	1.99±0.76#	2.308±0.008##	151.75±11.34##
生血宁 100 mg/kg 组	1.85±0.53#	2.551±0.011##	140.74±9.80##

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

表 8 生血宁对小鼠 EPO、SCF、SOD 和 MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	EPO/(IU/L)	SCF/(ng/L)	SOD/(U/mL)	MDA/(μmol/L)
正常对照组	2.62±0.25	12.81±0.89	140.38±4.29	4.14±0.37
模型组	2.34±0.22*	8.04±0.85**	186.69±6.13**	7.41±0.56**
氯化血红素组	2.47±0.23	8.03±0.90	187.06±6.76	6.86±0.64
生血宁 400mg/kg 组	2.51±0.26	11.95±0.91##	183.64±6.87	4.84±0.52##
生血宁 200mg/kg 组	2.45±0.23	12.78±0.97##	183.14±6.88	5.08±0.61##
生血宁 100mg/kg 组	2.51±0.25	12.04±0.90##	180.87±6.52	5.84±0.57##

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

紊乱^[8]。循环过程中的红细胞极易遭受自由基攻击而发生脂质过氧化损伤,造成红细胞衰老,导致体内清除自由基的抗氧化酶(SOD 和 ATP 酶)活性降低,细胞膜脂质过氧化产物(MDA)含量增高。本研究表明,生血宁能明显抑制红细胞的氧化衰老和自然衰老,显著提高细胞膜 Na-K-ATP 酶活性,降低 MDA 含量,提示生血宁对红细胞衰老有保护作用。但并未发现生血宁对 SOD 的作用,提示生血宁对红细胞衰老的保护作用可能与 SOD 无关。

有研究发现,细胞膜流动性同 Na-K-ATP 酶活

3.7 生血宁对再生障碍性贫血小鼠 EPO、SCF、SOD 和 MDA 的影响 结果如表 8 所示,与模型组比较,生血宁各组 SCF 显著升高,MDA 显著降低。

4 讨论

红细胞在血液循环系统中起到携氧、清除自由基、内环境维稳和调节酸碱平衡的作用,红细胞衰老是新陈代谢的自然现象,但当红细胞衰老远大于生成速度时,就会引发贫血等恶性疾病。有报道指出,红细胞衰老是氧化损伤增加导致的生理功能下降和

性呈正相关^[9]。本实验结果表明,生血宁能够提高细胞膜 Na-K-ATP 酶的活性,提高红细胞膜流动性,再次印证了这一结论。红细胞膜正常的结构是维持红细胞生命活动和功能发挥的必要条件,红细胞衰老的特征之一就是膜渗透脆性大,通透性高,流动性低。在红细胞膜功能实验中,生血宁 20 μg/mL 时显著降低红细胞膜渗透脆性及通透性,提高红细胞膜流动性,提示生血宁能有效改善红细胞膜生理功能,延缓细胞衰老进程。红细胞变形性是反映红细胞膜结构和功能是否正常的重要指标,红细

胞变形性降低与红细胞寿命缩短显著相关,生血宁改善红细胞膜功能,可能与生血宁有助于维持红细胞变形性有关。

再生障碍性贫血是骨髓造血功能衰竭、免疫功能紊乱、造血微环境损伤导致全血细胞减少的一组综合征^[10]。目前常用疗法有骨髓移植和免疫抑制治疗,骨髓移植费用高昂,条件苛刻,适用人群有限^[11],免疫抑制治疗后复发死亡率高,且易引发多种恶性疾病^[12]。中医药治疗再障在国内研究机构一直备受关注,在恢复骨髓的造血功能,改善骨髓造血微环境,提高患者的生存质量等方面有独特优势^[13]。生血宁即中药蚕砂提取物,张学忠等临床观察发现生血宁配合环孢菌素 A 治疗慢性再生障碍性贫血行之有效^[5]。魏克民运用自拟方联合生血宁治疗再生障碍性贫血,效果显著^[4]。本文采用苯建立再障模型,结果显示生血宁对小鼠再障模型有一定抗贫血作用,可显著增加干细胞因子 SCF,对红细胞计数的增加呈剂量相关性,可促进贫血小鼠外周血网织红细胞数、血红蛋白含量显著恢复。提示生血宁片改善机体造血系统,促进造血干细胞、祖细胞的增殖和分化,扩充血容量。体外造血祖细胞集落生成实验结果显示,生血宁能明显提高小鼠骨髓 CFU-E、CFU-GM 和 CFU-F 的增殖分化能力,证实生血宁有改善造血微环境,刺激骨髓造血作用。此外,与体外抗红细胞衰老实验结果一致,体内实验结果显示,生血宁能够有效减少机体过氧化损伤,对再生障碍性贫血模型小鼠 SOD 活力无明显影响,但能显著降低血清 MDA 含量。糖蛋白类激素 EPO 可以刺激骨髓造血,促进红系祖细胞分化为成熟红细胞,增加血液循环中的红细胞数量^[14,15]。体内研究显示,再障贫血模型中生血宁对 EPO 无明显影响,提示生血宁的抗贫血作用不单单是通过刺激骨髓造血,还通过维持红细胞变形性,抵抗红细胞衰老发挥作用的。

综上所述,生血宁有很强的抗红细胞衰老作用,对苯诱导的小鼠再生障碍性贫血有显著治疗效果,其作用机制可能与维持红细胞变形性与改善造血微环境有关,有望成为一种很有前景的再生障碍性贫血治疗药物。

参 考 文 献

[1] 田生望,肖乾秀,季业伟,等. 叶绿素及其衍生物的实验

与临床研究简析[J]. 中医学刊, 2004, 22(2): 286-288.

- [2] 骆丹东,傅小玲,王江潮. 生血宁治疗缺铁性贫血的临床疗效与观察[J]. 中华全科医学, 2015, 13(2): 225-226, 262.
- [3] 张林,姜丹,甘晓辉. 铁叶绿酸钠治疗缺铁性贫血的安全性及有效性的系统评价[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 35(5): 45-49.
- [4] 符陆帅,魏克民. 魏克民教授治疗再生障碍性贫血经验撷菁[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(7): 848-850.
- [5] 张学忠,徐燕丽,金娟,等. 中药生血宁加环孢菌素 A 治疗慢性再生障碍性贫血的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(8): 684.
- [6] 杜莉莉,刘希民. 重型再生障碍性贫血的治疗进展[J]. 中国医学工程, 2011, 19(5): 161-162.
- [7] Shinitzky M, Barenholz Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 515(4): 363-394.
- [8] Glass GA, Gershon D. Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging[J]. *Biochem J*, 1984, 218(2): 531-537.
- [9] Bhalla P, Agraw a D. Alterations in rat erythrocyte membrane due to hexachlorocyclohexane(technical) exposure[J]. *Hum Exp Toxicol*, 1998, 17(11): 638-642.
- [10] brodsky RA, Jones RJ. Aplastic anemia [J]. *Lancet*, 2005, 365(9471): 1647-1656.
- [11] Ades L, Mary JY, Robin M, et al. Long-term outcome after bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia[J]. *Blood*, 2014, 103(7): 2490-2497.
- [12] Frickhofen N, Heimpel H, Kaltwasser JP, et al. Anti-thymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year follow-up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia [J]. *Blood*, 2003, 101(4): 1236-1242.
- [13] 祁昌杰,柴立民,许明东,等. 再生障碍性贫血中医药防治研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(26): 5174-5177.
- [14] Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues[J]. *Oncologist*, 2004, 9(S5): 18-30.
- [15] Watowich SS. The erythropoietin receptor: molecular structure and hematopoietic signaling pathways[J]. *J Investig Med*, 2011, 59(7): 1067-1072.