

芍药内酯苷、芍药苷对放射线辐照致血虚小鼠 IL-3, GM-CSF, IL-6 及 TNF- α 的影响

王成龙 王林元 王景霞 朱映黎 赵丹萍 张建军

(北京中医药大学, 北京, 100029)

摘要 目的:研究芍药内酯苷、芍药苷对放射线辐照致血虚小鼠的补血作用及对白细胞介素-3(IL-3)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等造血细胞因子的调控机制。方法:采用放射线辐照法复制小鼠血虚模型,灌胃芍药内酯苷、芍药苷,检测小鼠外周血象、胸腺与脾脏指数及分离血清、血浆,分析 IL-3、GM-CSF、IL-6、TNF- α 的含量。结果:与模型组比较,芍药内酯苷 30 mg/kg 组及 15 mg/kg 组和芍药苷 30 mg/kg 组及 15 mg/kg 组均能升高白细胞值($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);芍药内酯苷 30 mg/kg 组及 15 mg/kg 组和芍药苷 30 mg/kg 组对红细胞值有升高作用($P < 0.05$);芍药内酯苷 30 mg/kg 组、芍药苷 30 mg/kg 组均能明显升高胸腺指数($P < 0.01$);芍药内酯苷 30 mg/kg 组、芍药苷 30 mg/kg 组明显升高 IL-3 含量水平($P < 0.01$);芍药内酯苷 30 mg/kg 组及 15 mg/kg 组和芍药苷 30 mg/kg 组均能升高 GM-CSF 含量水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);芍药内酯苷 30 mg/kg 组明显降低 TNF- α 含量水平,差异有统计学意义($P < 0.01$),芍药苷 30 mg/kg 组亦能降低 TNF- α 含量水平($P < 0.05$)。结论:芍药内酯苷作为白芍的特征性有效成分,与芍药苷一致具有补血作用;二者都通过对机体细胞造血因子的调控作用,促进血细胞的生成,维持造血功能的稳定,是白芍养血敛阴功效的物质基础。

关键词 芍药内酯苷;芍药苷;放射线辐照法;血虚证;造血细胞因子

Study of Blood Nourishing Effects of Albiflorin and Paeoniflorin on Blood Deficiency Mouse Model Induced by Irradiation of and Effect on Levels of IL-3, GM-CSF, IL-6 and TNF- α

Wang Chenglong, Wang Linyuan, Wang Jingxia, Zhu Yingli, Zhao Danping, Zhang Jianjun

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To explore the blood nourishing effect and mechanism of Albiflorin and Paeoniflorin on mouse model of blood deficiency syndrome induced by irradiation and its effect on levels of IL-3, GM-CSF, IL-6 and TNF- α . **Methods:** Mouse model of blood deficiency syndrome was induced by irradiation. Albiflorin and Paeoniflorin were given through gavage. The amount of WBC, RBC, HGB, index of thymus gland and spleen and the levels of GM-CSF, IL-3, IL-6 and TNF- α in serum were detected by radioimmunoassay. **Results:** Compared with the model group, the amount of WBC and index of thymus gland in the group of 30 mg/kg Albiflorin and 30 mg/kg Paeoniflorin were both increased significantly ($P < 0.01$), and RBC increased in 15 mg/kg Albiflorin and 15 mg/kg Paeoniflorin significantly ($P < 0.05$). The levels of IL-3 in serum in groups of 15 mg/kg Albiflorin, 30 mg/kg Paeoniflorin increased significantly ($P < 0.05$). The levels of GM-CSF in serum in groups of 15 mg/kg Albiflorin, 30 mg/kg Paeoniflorin increased significantly ($P < 0.05$), and the levels of GM-CSF in serum in group of 30 mg/kg Albiflorin increased significantly ($P < 0.01$). The level of TNF- α in serum in groups of 30 mg/kg Paeoniflorin reduced significantly ($P < 0.05$), and the level of TNF- α in serum in group of 30 mg/kg Albiflorin were reduced significantly ($P < .001$). **Conclusion:** Albiflorin, as a special compound in Debark Peony Root, which has the same hematopoietic effect as Paeoniflorin. Albiflorin and Paeoniflorin both can nourish blood and yin by cytokines regulation, which is the material basic of Debark Peony Root.

Key Words Albiflorin; Paeoniflorin; Irradiation; Blood deficiency syndrome; Cytokines

中图分类号:R256.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.08.050

白芍^[1]有养血敛阴之功,常用于血虚萎黄,月经不调。现代药理研究表明^[2-3],白芍含有单萜及其苷类化合物,其中含量相对较多的 2 个成分分别为芍

药苷与芍药内酯苷,中国药典规定芍药苷为白芍的标志性成分,但芍药苷同时也是赤芍的标志性成分^[1],文献对其报道较多,而芍药内酯苷研究较

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81473370)

作者简介:王成龙(1988.12—),男,2014 级在读硕士研究生,研究方向:基于中药基础理论的药效机制及物质基础研究,E-mail:18810900709@163.com

通信作者:张建军(1965.08—),女,医学博士,研究员,博士研究生导师,研究方向:基于中药基础理论的药效机制及物质基础研究,Tel:(010)64286993,E-mail:zjj59@163.com

少^[4]。课题组前期研究^[4-5]表明芍药苷、芍药内酯苷均具有补血作用,芍药内酯苷为白芍的特征性成分。本实验通过芍药内酯苷和芍药苷对放射线辐照致血虚小鼠的补血作用以及对 GM-CSF、IL-3、IL-6 与 TNF- α 影响的研究,探讨白芍特征成分芍药内酯苷及有效成分芍药苷补血作用的特点及机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性昆明种小鼠,体重(20 ± 2) g,购自北京斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供[许可证号:SCXK(京)2014-0004]。

1.1.2 药物 实验用芍药内酯苷、芍药苷:自制,纯度均高于 96%;阳性药四物颗粒,吉泰安(四川)药业有限公司生产,批号:1511133,经本室 HPLC 测定芍药内酯苷质量分数为 0.329%、芍药苷质量分数为 0.64%。

1.1.3 仪器与试剂 放射源由军事医学科学院放射所提供;Beckman Coulter Ac. T5 血细胞分析仪(美国 Beckman Coulter Inc);Beckman Coulter Ac. T 5diff Rinse(批号:05202C2),Ac. T 5diff WBC Lyse(批号:20402B),Ac. T 5diff Fix(批号:21802E),Ac. T 5diff Hgb Lyse(批号:06902A2);试剂由北京华英生物技术研究所提供,Stat Fax 2100 全自动酶标仪(Awareness Technology Inc. USA);IL-3 测试盒:北京华英生物技术研究所(批号:201510730),GM-CSF 测试盒:北京华英生物技术研究所(批号:201510730),TNF- α 测试盒:北京华英生物技术研究所(批号:201510730),IL-6 测试盒:北京华英生物技术研究所(批号:201510730)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与给药方法 将 108 只小鼠随机分成 9 个组,即空白组,模型组、四物颗粒组(2.5 g/kg 相当于人用量 15 g/d,2.5 g 四物颗粒中含芍药内酯苷 8.225 mg,含芍药苷 16 mg)、芍药内酯苷组(30 mg/kg、15 mg/kg、7.5 mg/kg)、芍药苷组(30 mg/kg、15 mg/kg、7.5 mg/kg),每组 12 只。预防给药 7 d,按每 10 g 体重灌胃 0.2 mL 给药,1 次/d。空白组、模型组每天灌胃去离子水。

1.2.2 造模方法 动物适应性喂养 5 d 后,预先给药 7 d,第 8 天采用⁶⁰Co γ 射线全身辐照 1 次,辐照剂量 3.5 Gy,剂量率 1.60 Gy/min,造成血虚证模型。辐照后小鼠连续灌胃 14 d,于第 14 天末,目内眦取血 1 mL,并室温静置 3~4 h 后以 4 500 r/min 离心

20 min,移取上清液,测定外周血液中白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)数量。摘眼球取血,分离收集血清,采用放射免疫法检测小鼠血清 GM-CSF、IL-3、IL-6、TNF- α 的含量。小鼠颈椎脱臼死亡后,快速取出脾脏及胸腺称重,分别计算与体重的比值。

1.3 统计学方法 本实验使用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间指标比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芍药内酯苷和芍药苷对体质量和胸腺指数及脾脏指数的影响 与空白组比较,模型组体质量显著低于空白组($P < 0.001$)。与模型组相比,四物颗粒组的体质量明显升高($P < 0.01$);芍药内酯苷 30 mg/kg 显著升高($P < 0.001$),芍药苷 30 mg/kg 组、芍药内酯苷 15 mg/kg 和芍药苷 15 mg/kg 组体质量明显升高($P < 0.01$)。与空白组比较,模型组的胸腺指数显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,四物颗粒组的胸腺指数显著升高($P < 0.001$);芍药内酯苷 30 mg/kg 和芍药苷 30 mg/kg 组明显升高胸腺指数($P < 0.01$),芍药内酯苷 15 mg/kg 组、芍药苷 15 mg/kg 组升高胸腺指数($P < 0.05$)。与空白组比较,模型组的脾脏指数降低($P < 0.05$);与模型组比较,四物颗粒组的脾脏指数升高($P < 0.05$);各受试给药组有升高脾脏指数的趋势差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 芍药内酯苷和芍药苷对白细胞数量、红细胞数量、血红蛋白数量的影响 与空白组比较,模型组的白细胞数量显著降低($P < 0.001$);与模型组相比,四物颗粒显著升高白细胞数量($P < 0.001$);芍药内酯苷 30 mg/kg 和芍药苷 30 mg/kg 组明显升高白细胞数量($P < 0.01$),芍药内酯苷 15 mg/kg 组、芍药苷 15 mg/kg 组升高白细胞($P < 0.05$)。与空白组比较,模型组的红细胞数量显著降低($P < 0.001$);与模型组相比,四物颗粒明显升高红细胞数量($P < 0.01$);芍药内酯苷 30 mg/kg 和芍药苷 30 mg/kg 组、芍药内酯苷 15 mg/kg 组升高红细胞数量($P < 0.05$)。与空白组比较,模型组的血红蛋白数量降低但差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较,四物颗粒有升高血红蛋白数量的趋势但差异无统计学意义($P > 0.05$);各受试给药组有升高血红蛋白数的趋势差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 芍药内酯苷和芍药苷对放射线辐照所致血虚小鼠的胸腺指数、脾脏指数的影响

组别	剂量	只数	体质量/g	胸腺指数	脾脏指数
空白	—	12	40.90±1.43	1.48±0.09	4.44±0.76
模型	—	12	36.25±1.30▲▲▲	1.09±0.13▲▲▲	3.85±0.39▲▲▲
四物颗粒	2.5 g/kg	12	38.49±1.71* *	1.36±0.21* * *	4.42±0.58 *
芍药苷	30 mg/kg	12	38.60±1.58* *	1.27±0.12* *	4.08±0.64
	15 mg/kg	12	38.26±1.93* *	1.25±0.19 *	4.09±0.57
	7.5 mg/kg	12	36.70±1.83	1.10±0.16	3.88±0.30
	30 mg/kg	12	39.05±1.98* * *	1.26±0.16* *	4.29±0.74
	15 mg/kg	12	38.73±2.23* *	1.23±0.16 *	4.07±0.77
芍药内酯苷	7.5 mg/kg	12	36.99±1.41	1.15±0.14	3.82±0.69

注:与空白组相比,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$,▲▲▲ $P<0.001$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

表 2 芍药内酯苷和芍药苷对放射线辐照法所致血虚小鼠的 WBC、RBC、HGB 的影响

组别	剂量	只数	WBC/($\times 10^9$ /L)	RBC/($\times 10^{12}$ /L)	HGB/($\times$ g/L)
空白	—	12	8.39±0.56	10.92±0.39	151.98±7.17
模型	—	12	4.09±0.24▲▲▲	9.77±0.43▲▲▲	148.35±5.90
四物颗粒	2.5 g/kg	12	6.79±0.38* * *	10.31±0.46* *	150.84±5.83
芍药苷	30 mg/kg	12	4.69±0.32* *	10.19±0.38 *	150.08±5.50
	15 mg/kg	12	4.45±0.41 *	10.13±0.48	150.12±5.83
	7.5 mg/kg	12	4.25±0.35	9.97±0.65	150.31±5.77
	30 mg/kg	12	4.70±0.46* *	10.27±0.34 *	150.35±5.66
	15 mg/kg	12	4.55±0.51 *	10.21±0.44 *	150.14±5.69
芍药内酯苷	7.5 mg/kg	12	4.25±0.45	9.98±0.58	149.01±6.13

注:与空白组相比,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$,▲▲▲ $P<0.001$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

表 3 芍药内酯苷和芍药苷对放射线辐照所致血虚小鼠的 IL-3、GM-CSF 的影响

组别	剂量	只数	IL-3	GM-CSF
空白	—	12	17.41±2.33	103.58±28.69
模型	—	12	11.93±1.46▲▲▲	73.51±15.83▲▲
四物颗粒	2.5 g/kg	12	15.86±2.37* * *	98.83±20.50* *
芍药苷	30 mg/kg	12	14.44±2.70* *	94.86±20.01 *
	15 mg/kg	12	13.81±1.41 *	90.47±20.19
	7.5 mg/kg	12	12.96±1.74	77.67±16.10
芍药内酯苷	30 mg/kg	12	15.09±2.73* *	101.96±17.63* *
	15 mg/kg	12	14.12±2.45 *	95.92±18.42 *
	7.5 mg/kg	12	13.04±2.42	85.32±27.57

注:与空白组相比,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$,▲▲▲ $P<0.001$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

2.3 芍药内酯苷和芍药苷对 IL-3、GM-CSF 数量的影响 与空白组比较,模型组的 IL-3 的含量显著降低($P<0.001$);与模型组比较,四物颗粒组的 IL-3 的含量显著升高($P<0.001$);芍药内酯苷 30 mg/kg 和芍药苷 30 mg/kg 组明显升高 IL-3 的含量($P<0.01$),芍药内酯苷 15 mg/kg 组、芍药苷 15 mg/kg 组能升高 IL-3 的含量($P<0.05$)。与空白组比较,模型组的 GM-CSF 的数量明显降低($P<0.01$);与模型组比较,四物颗粒组的 GM-CSF 的含量明显升高($P<0.01$);芍药内酯苷 30 mg/kg 和芍药苷 30 mg/kg、芍药内酯苷 15 mg/kg 组升高 GM-CSF 的含

量($P<0.05$),其中芍药内酯苷 30 mg/kg 组明显升高 GM-CSF 的含量($P<0.01$)。见表 3。

表 4 芍药内酯苷和芍药苷对放射线辐照所致血虚小鼠的 IL-6、TNF-α 的影响

组别	剂量	只数	IL-6	TNF-α
空白	—	12	111.83±10.67	56.56±6.95
模型	—	12	120.37±10.81	62.38±2.92▲▲
四物颗粒	2.5 g/kg	12	114.90±10.18	57.29±3.80* *
芍药苷	30 mg/kg	12	115.27±12.66	58.40±4.43 *
	15 mg/kg	12	118.30±13.83	61.02±4.11
	7.5 mg/kg	12	120.62±10.13	62.97±3.45
芍药内酯苷	30 mg/kg	12	112.82±13.54	57.13±4.28* *
	15 mg/kg	12	117.01±13.88	59.23±5.93
	7.5 mg/kg	12	120.53±13.25	62.55±4.28

注:与空白组相比,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$,▲▲▲ $P<0.001$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

2.4 芍药内酯苷和芍药苷对 IL-6、TNF-α 数量的影响 与空白组比较,模型组的 IL-6 的含量明显升高($P<0.01$);与模型组比较,四物颗粒组的 TNF-α 的含量降低差异无统计学意义($P>0.05$);芍药内酯苷 30 mg/kg 组能降低 IL-6 的含量($P<0.05$),而其他各剂量组有降低 IL-6 的趋势但差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白组比较,模型组 TNF-α 的含量明显降低($P<0.01$);与模型组比较,四物颗粒组 TNF-α 的含量明显降低($P<0.01$);芍药内酯苷 30

mg/kg 组明显降低 TNF- α 的含量 ($P < 0.01$), 芍药苷 30 mg/kg 组能降低 TNF- α ($P < 0.05$), 其他各剂量组的芍药内酯苷和芍药苷对 TNF- α 的影响不大且差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

3 讨论

血虚证是临床常见病症,多由大病亏虚、脾胃虚弱、生血无源、失血过多等不同原因引起。放射线辐照法^[6]是公认的动物血虚证模型的造模方法之一,辐照能导致造血功能低下甚至衰竭,白细胞从造模后第 1 天开始就显著降低,后期红细胞数量明显减少,血红蛋白含量降低,同时引起免疫力低下,从而诱发感染、贫血、出血等并发症,因此,这种方法模拟的血虚证与临床患者的血虚状态相似。高月^[7]等通过实验比较四物汤的治疗后发现,3.5 Gy ⁶⁰Co γ 射线是制作该辐照模型的最佳剂量。因此,本实验选择了用 3.5 Gy ⁶⁰Co γ 射线全身一次性照射昆明小鼠复制血虚动物模型。我们采用其成方颗粒剂型作为阳性对照药,并经本实验室 HPLC 测定芍药内酯苷及芍药苷含量,表明在本实验给药剂量下,二者在四物颗粒成方制剂中的用量与本实验二者的单一成分给药剂量相当。

实验结果显示,芍药内酯苷与芍药苷对放射线辐照所致血虚小鼠有明显的补血作用,尤其对白细胞和红细胞数量的升高作用明显且与四物颗粒的作用相似,为证实芍药内酯苷是白芍的特征有效成分提供了进一步的药理实验依据^[8]。同时二者对胸腺指数的升高作用表明其可刺激血虚状态下胸腺细胞的增殖,调节免疫功能。据本课题组前期研究显示^[9],芍药内酯苷和芍药苷能够通过机体的免疫调节作用对抗环磷酰胺导致的血虚状态,是白芍“养血”功效的有效成分。据此,本实验选用放射线辐照模型进一步从免疫机制及造血细胞因子水平,探讨二者补血特点和作用机制。

免疫器官是机体免疫细胞的发源地,造血干/祖细胞在此发育分化为成熟的免疫细胞。放射线辐照法致血虚小鼠的实质为骨髓造血功能的损伤和机体免疫应答的抑制^[10]。临床研究^[11]发现人体在贫血状态时,各种免疫功能均下降,细胞因子的活化,能够在一定程度阐明保护及修复造血干/祖细胞的机制,而研究芍药内酯苷和芍药苷对于不同造血细胞因子的调节作用能揭示二者在补血作用机制上的特点。高月^[12]等人研究显示,芍药苷可促进骨髓基质细胞分泌造血因子 G-CSF、GM-CSF、血小板衍生生长因子- α (PDGF- α) 等,抑制造血抑制因子巨噬细胞炎

性蛋白 (MIP) 的分泌,从而发挥补血作用。本实验结果显示,芍药内酯苷和芍药苷作为白芍的 2 个主要成分都具有明确的补血作用并且均作用于正向造血细胞因子 IL-3、GM-CSF,促进多能祖细胞的增殖,而且还能降低 TNF- α 水平来抑制原始造血干细胞进入细胞周期而发挥保护造血细胞避免辐照损伤的细胞毒作用,从而对抗放射线辐照导致的血虚状态。这与本课题组前期研究结果相一致。

本课题组研究报道^[4,5]芍药内酯苷是白芍补血作用的特征有效成分。据本实验结果我们推测,芍药内酯苷的补血机制可能与其调节多种造血因子有关,其中既有正向因子,也有负向因子,在白芍中与芍药苷等成分协同作用,从正负 2 个方面调控血细胞的生成,维持造血功能的稳定。为进一步研究传统补血药白芍的特征成分芍药内酯苷的补血作用及机制,还需从基因及蛋白水平深入进行。

致谢:感谢北京中医药大学科研实验中心李伟老师对本次实验的大力支持!

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 104-105, 158-159.
- [2] 王巧, 郭洪祝, 霍长虹, 等. 白芍化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 972-976.
- [3] 周红涛, 骆亦奇, 胡世林, 等. 赤芍与白芍的化学成分含量比较研究 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(9): 654-657.
- [4] 张建军, 黄银峰, 王丽丽, 等. 白芍、赤芍及芍药苷、芍药内酯苷对综合放血法致血虚小鼠补血作用的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3358-3362.
- [5] 张建军, 李伟, 王丽丽, 等. 赤芍和白芍品种、功效及临床应用述评 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3595-3601.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1054.
- [7] 高月. 血虚证实质及四物汤反证研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(4): 58-60.
- [8] 屈胜胜, 张建军, 黄银峰, 等. 芍药苷、芍药内酯苷对放射线辐照法致血虚小鼠的补血作用 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2952-2955.
- [9] 朱映黎, 张建军, 王景霞, 等. 芍药内酯苷和芍药苷对环磷酰胺致血虚小鼠的补血作用及对 GM-CSF、IL-3、TNF- α 影响的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 330-333.
- [10] 马增春, 高月. 血虚证的病理研究概况 [J]. 新中医, 2000, 32(9): 60-61.
- [11] Gong H, Shen P, Jin L, et al. Therapeutic effects of Lycium barbarum polysaccharide (LBP) on irradiation or chemotherapy-induced myelosuppressive mice [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2005, 20(2): 155-62.
- [12] 高月, 马增春, 谭洪玲, 等. 四物汤及其提取物对辐照致血虚证小鼠造血作用的研究 [J]. 天津中医药, 2003, 20(6): 47-51.