

文章编号: 1674-8085 (2022) 02-0067-06

桂附地黄丸对环磷酰胺致免疫抑制小鼠血常规和血清生化指标影响

胡 建, 靳二辉, *胡忠泽

(安徽科技学院动物科学学院, 安徽, 凤阳 233100)

摘 要: 探究桂附地黄丸对环磷酰胺致免疫抑制小鼠的血常规及血清生化指标的影响。将 24 只雌性的昆明种小白鼠分为对照组(CT)、模型组(CTX)和给药组(GDT)。按照 1.82 g/kg·d 体重剂量给 GDT 小鼠灌胃桂附地黄丸悬液;在灌胃的第 12 d, 将环磷酰胺按照 50 mg/kg·d 体重剂量给 CTX 和 GDT 小鼠进行腹腔注射, 连续注射 3 d。最后一次用药 12 h 后, 称重后采集血液检测血常规及生化指标。结果显示, 与 CT 相比, CTX 小鼠白细胞总数、单核细胞总数、淋巴细胞总数、血小板分布宽度、总蛋白含量显著降低 ($P < 0.05$), 尿素氮含量显著升高 ($P < 0.05$); 与 CTX 相比, GDT 小鼠单核细胞总数、中性粒细胞总数、中性粒细胞百分比、平均红细胞血红蛋白含量、平均红细胞血红蛋白浓度、肌酐含量显著提升 ($P < 0.05$), 淋巴细胞百分比、谷草转氨酶含量显著下降 ($P < 0.05$)。因此, 桂附地黄丸可以有效改善环磷酰胺引起小鼠血常规和血清生化指标的异常变化。

关键词: 桂附地黄丸; 环磷酰胺; 血常规; 生化指标

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2022.02.011

EFFECTS OF GUIFU DIHUANG PILLS ON BLOOD ROUTINE AND SERUM BIOCHEMICAL INDICATORS IN CYCLOPHOSHAMIDE INDUCED IMMUNOSUPPRESSIVE MICE

HU Jian, JIN Er-hui, *HU Zhong-ze

(College of Animal Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100, China)

Abstract : To discovery the effects of Guifu Dihuang Pills on the blood routine and serum biochemical indicators in cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice. Twenty-four female Kunming breed mice were divided into a control group (CT), a model group (CTX) and a Guifu Dihuang Pills treated group (GDT). The GDT mice were given Guifu Dihuang pill suspension by gavage according to the dose of 1.82 g/kg body weight (once a day for 14 days). On day 12 of intragastric, the CTX and the GDT were given intraperitoneal injection with 50 mg/kg *b.w.* cyclophosphamide (once a day for 3 days). 12 hours after the last dose, after weighing, blood was collected to detect blood routine examination and biochemical indexes. The results showed that compared with CT, the white blood cell count, monocyte count, lymphocyte count, platelet distribution width and total protein contents were significantly lower ($P < 0.05$) and the contents of urea nitrogen were significantly higher ($P < 0.05$) in CTX mice. Compared with CTX, the total monocytes, total neutrophils, percentages of neutrophils, mean corpuscular

收稿日期: 2021-07-09; 修改日期: 2021-09-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31402154); 安徽省重点研究与开发计划项目(202104a06020033); 安徽省教育厅重大项目(KJ2016SD15); 安徽高校协同创新项目(GXXT-2019-035); 滁州市科技计划项目(2019ZN003)

作者简介: 胡 建(1992-), 女, 安徽六安人, 硕士生, 主要从事中草药药理研究(E-mail:346721207@qq.com);

*胡忠泽(1963-), 男, 安徽桐城人, 教授, 硕士, 从事中草药药理及应用研究(E-mail:hzhongze@126.com).

hemoglobin contents, mean corpuscular hemoglobin concentrations and the creatinine contents were significantly higher ($P < 0.05$), and the lymphocyte percentages, aspartate aminotransferase contents were significantly lower ($P < 0.05$) in GDT mice than those in CTX mice. Thus, Guifu Dihuang Pills could effectively improve the abnormal changes of blood routine and serum biochemical indexes in cyclophosphamide-induced mice.

Key words: Guifu Dihuang Pill; cyclophosphamide; blood routine examination; biochemical index

癌症是严重威胁人类生命和社会发展的重大疾病,而环磷酰胺作为一种常见的细胞抑制剂,由于其具有良好的临床疗效,目前已广泛应用于癌症的治疗,如恶性淋巴瘤、乳腺癌、肺癌等^[1-3]。作为一种很强的免疫抑制剂,通过在机体体内与细胞的DNA发生烷基化作用,从而抑制肿瘤细胞的生长繁殖,但在使用过程中会使机体出现白细胞减少、肝肾损伤等副作用^[4]。有研究发现,环磷酰胺的使用会对血液细胞造成一定的损害,其中白细胞减少最为显著,同时还会导致机体的免疫力下降^[5]。郭肖等^[6]发现,环磷酰胺的使用会引起谷草转氨酶、尿素氮等肝肾功能指标的异常。因此,如何防治环磷酰胺在临床使用的过程中引起的不良反应是目前亟待解决的问题。蔡涛等^[7]研究发现,环磷酰胺引起的不良反应在中医上属于肾阳虚症状,通过服用适量温补肾阳的药物则可以有效缓解该症状。

桂附地黄丸是在《金匱要略》所载肾气丸的基础上进行化裁所得,由肉桂、附子、熟地黄、山茱萸、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻这8味中药组成,是温补肾阳的重要方药之一,多用于肾阳不足、腰膝酸软、小便不利或反多、痰饮咳喘等症状^[8]。其中,肉桂、附子具有补火助阳、活血通经的功效,熟地黄可以补血滋阴、益精填髓,山茱萸可以健胃补血、补益阴肾,牡丹皮具有清热凉血、活血化瘀的功效,山药可以健脾补肺、固肾益精,茯苓、泽泻可以利水渗湿、泄热宁心,因此,诸药合用使得该方在“阴中求阳”中起到了温补肾阳的功效,并成为代表方药之一,且具有良好的药用效果。陈嵘等^[9]研究表明,服用桂附地黄丸可以有效改善因肾阳虚所引起的不良症状。而目前桂附地黄丸对环磷酰胺引起的血常规和血清生化指标的异常是否有作用效果却鲜有报道。因此,本研究通过使用环磷

酰胺构建免疫抑制的小鼠模型,探究桂附地黄丸对环磷酰胺致免疫抑制小鼠血常规、血清生化指标的影响,从而为临床应用桂附地黄丸防治环磷酰胺所引起的血常规、血清生化指标的异常提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

体重 (20 ± 2) g的昆明种雌性小白鼠24只,购于安徽医科大学实验动物中心,饲养温度为 $(22 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 $(60 \pm 5)\%$,自由进食和饮水,并每天更新水和食物。

1.2 试验药物和仪器

桂附地黄丸(北京同仁堂,国药准字Z20055685);环磷酰胺(Aladdin上海公司,生产批号F1812016);BC-2600Vet血液细胞分析仪及配套试剂(Mindray深圳公司);DP180生化分析仪及配套试剂(广州东唐公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与给药方法

将24只小鼠适应性饲养7 d后,随机抽取分为对照组(CT)、环磷酰胺制免疫抑制模型组(CTX)、桂附地黄丸给药组(GDT),每组8只。取适量的桂附地黄丸按比例溶于生理盐水制成 0.227 g/mL 的悬液,GDT按照 1.82 g/kg b.w. 剂量进行灌胃,连续14 d每天1次;CT和CTX用生理盐水进行相同体重剂量灌胃。在灌胃的12 d,按照 50 mg/kg b.w. 剂量连续3 d对CTX和GDT小鼠进行环磷酰胺腹腔注射,每天1次;同时用同等 $b.w.$ 剂量的生理盐水给CT的小鼠进行腹腔注射。在最后一次注射环磷酰胺12 h后,对三组小鼠进行称重和眼球采血,并

分别用 EP 管和抗凝 EP 管进行保存,采血后颈椎脱臼处死所有小鼠。

1.3.2 血常规分析

按照 BC-2600Vet 血液细胞分析仪的使用要求,对三组小鼠的抗凝血进行检测,记录并分析所有数据。

1.3.3 生化检测

使用 TG16A 高速离心机对所采集的小鼠非抗凝血液进行分离,取小鼠血清后,使用 DP180 全自动生化分析仪检测并分析数据。

1.4 统计学分析

本研究所有数据在使用 Excel 进行初步分析后,采用 SPSS 21.0 统计软件进行单因素方差分析,并用 Duncan 法进行两组间的相互比较,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 的方式表示, $P < 0.05$ 表示两组间具有显著性差异。

2 结果

2.1 桂附地黄丸对 CTX 小鼠体重的影响

将 CT、CTX 与 GDT 进行两两间的相互比较,发现其体重无显著性变化 ($P > 0.05$)。结果见图 1。

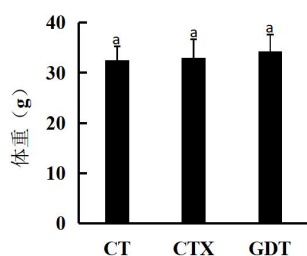


图 1 桂附地黄丸对 CTX 小鼠体重的影响

Fig.1 Effect of Guifu Dihuang Pills on body weight in CTX induced mice

字母相同说明差异不显著, $P > 0.05$; 字母不同说明差异显著, $P < 0.05$; 下同

2.2 桂附地黄丸对 CTX 小鼠血常规的影响

2.2.1 桂附地黄丸对 CTX 小鼠白细胞的影响

与 CT 相比, CTX 的白细胞总数、单核细胞总数和淋巴细胞总数显著降低 ($P < 0.05$); 而中性粒细胞总数、淋巴细胞百分比、单核细胞百分比和中性粒细胞百分比皆无显著性变化 ($P > 0.05$)。与 CTX 相比, GDT 的单核细胞总数、中性粒细胞总

数和中性粒细胞百分比显著提升 ($P < 0.05$); 淋巴细胞百分比显著降低 ($P < 0.05$); 而白细胞总数、淋巴细胞总数和单核细胞百分比无显著变化 ($P > 0.05$)。结果见图 2。

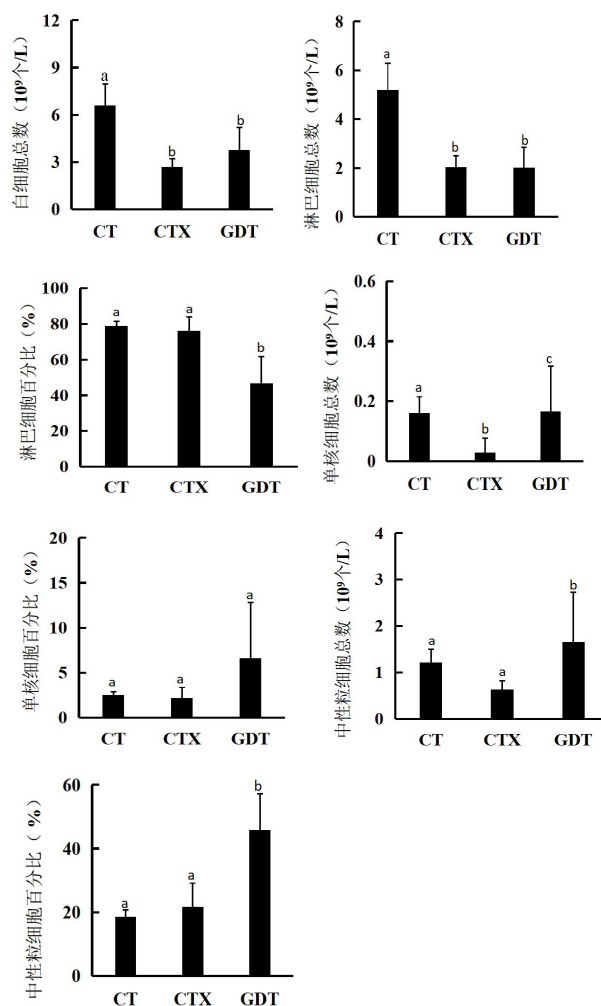
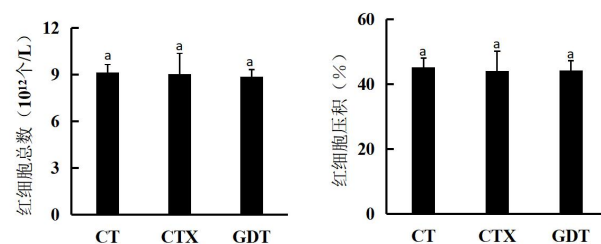


图 2 桂附地黄丸对 CTX 小鼠白细胞的影响

Fig.2 Effect of Guifu Dihuang Pills on white blood cell in CTX induced mice

2.2.2 桂附地黄丸对 CTX 小鼠红细胞的影响

将 CT、CTX、GDT 三组相互比较发现,小鼠的红细胞总数、红细胞压积、平均红细胞体积与红细胞分布宽度皆无显著性变化 ($P > 0.05$)。结果见图 3。



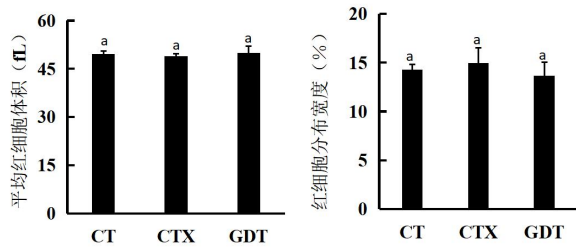


图3 桂附地黄丸对 CTX 小鼠红细胞的影响

Fig.3 Effect of Guifu Dihuang Pills on red blood cell in CTX induced mice

2.2.3 桂附地黄丸对 CTX 小鼠血小板的影响

与 CT 相比, CTX 的血小板分布宽度显著降低 ($P < 0.05$); 而血小板数目、平均血小板体积与血小板压积无显著变化 ($P > 0.05$)。与 CTX 相比, GDT 的血小板数目、平均血小板体积、血小板分布宽度与血小板压积皆无显著变化 ($P > 0.05$)。结果见图 4。

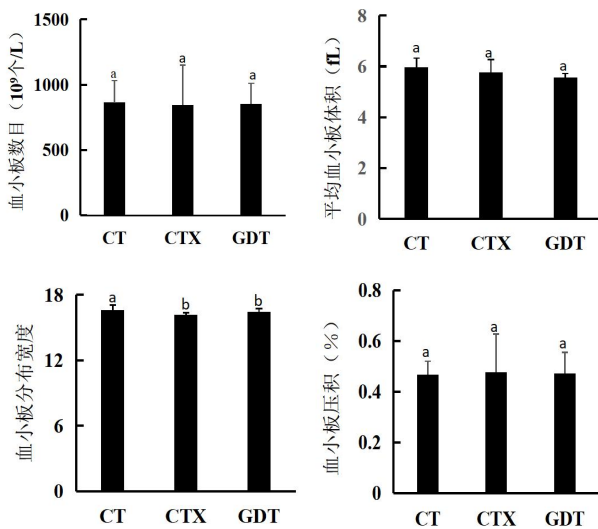


图4 桂附地黄丸对 CTX 小鼠血小板的影响

Fig.4 Effect of Guifu Dihuang Pills on platelet in CTX induced mice

2.2.4 桂附地黄丸对 CTX 小鼠血红蛋白的影响

与 CT 相比, CTX 的血红蛋白含量、平均红细胞血红蛋白含量与平均红细胞血红蛋白浓度没有显著变化 ($P > 0.05$)。与 CTX 相比, GDT 的平均红细胞血红蛋白含量与平均红细胞血红蛋白浓度显著提升 ($P < 0.05$); 血红蛋白含量无显著变化 ($P > 0.05$)。结果见图 5。

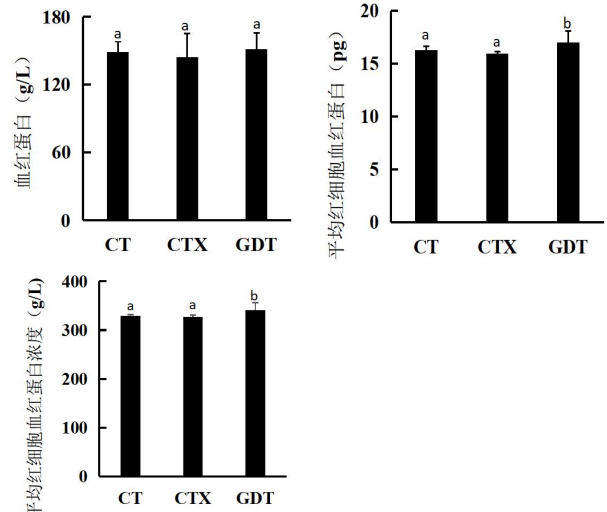


图5 桂附地黄丸对 CTX 小鼠血红蛋白的影响

Fig.5 Effect of Guifu Dihuang Pills on hemoglobin in CTX induced mice

2.3 桂附地黄丸对 CTX 小鼠血清生化指标的影响

2.3.1 桂附地黄丸对 CTX 小鼠肝功能四项指标的影响

与 CT 相比, CTX 的总蛋白含量显著降低 ($P < 0.05$); 而白蛋白含量、谷丙转氨酶含量与谷草转氨酶含量皆无显著性变化 ($P > 0.05$)。与 CTX 相比, GDT 的谷草转氨酶含量显著降低 ($P < 0.05$); 而总蛋白、白蛋白与谷丙转氨酶含量无显著变化 ($P > 0.05$)。结果见图 6。

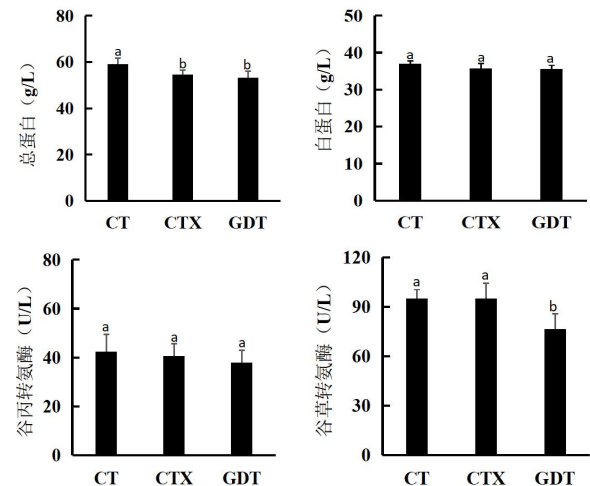


图6 桂附地黄丸对 CTX 小鼠肝功能四项指标的影响

Fig.6 Effect of Guifu Dihuang Pills on four indexes of liver function in CTX induced mice

2.3.2 桂附地黄丸对 CTX 小鼠肾功能三项指标的影响

与 CT 相比, CTX 的尿素氮含量显著升高 ($P < 0.05$); 而肌酐、尿酸含量无显著变化 ($P > 0.05$)。

与CTX相比,GDT的肌酐含量显著上升($P < 0.05$);而尿素氮与尿酸含量无显著变化($P > 0.05$)。结果见图7。

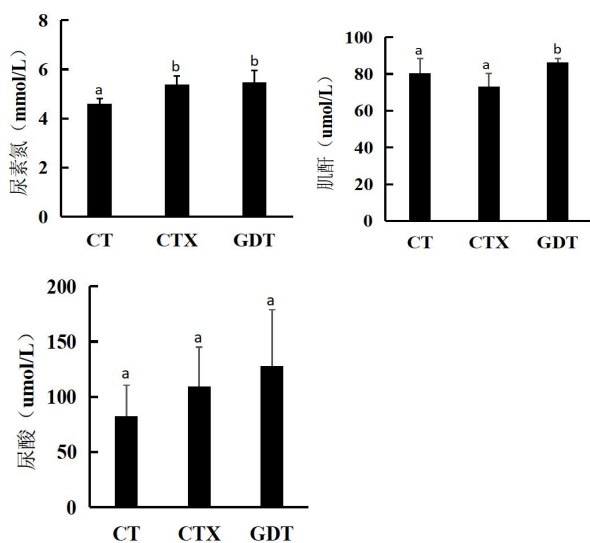


图7 桂附地黄丸对CTX小鼠肾功能三项指标的影响

Fig.7 Effect of Guifu Dihuang Pills on three indexes of renal function in CTX induced mice

3 讨论

癌症是一种与活细胞的异常增殖和生长分裂有关的疾病,环磷酰胺因其价格低、效果好,多作为抗肿瘤药物及免疫抑制剂在临床上使用,但是环磷酰胺的使用也会使免疫功能受损、血常规异常、肝肾功能受损。高敏等^[10]研究表明,环磷酰胺的使用会让白细胞、淋巴细胞等免疫细胞受到不同程度的损害。韦风华等^[11]发现,环磷酰胺的使用会对血液细胞造成一定的损害,其中白细胞减少最为显著。王怡菲等^[12]研究表明,机体的肝脏和肾脏因环磷酰胺的使用产生了不同程度的毒副作用。在本研究中,与CT相比,CTX小鼠的白细胞总数、单核细胞总数、淋巴细胞总数、血小板分布宽度与总蛋白含量显著降低,则说明环磷酰胺的使用造成了CTX小鼠的血细胞异常,其中白细胞作为参与机体免疫的重要组成部分,其总数的显著降低则说明环磷酰胺抑制了机体免疫。同时,CTX小鼠的尿素氮含量显著高于CT,即环磷酰胺造成了CTX小鼠的肾脏损伤。由此可见,在本研究中环磷酰胺的使用

造成了模型组小鼠的血常规、血清生化指标的异常。

同时研究表明,环磷酰胺使用也会引起肾阳虚症状^[7]。肾阳作为机体的阳气之本,可以推动、激发脏腑的各种生理机能,温煦机体全身的脏腑形体官窍,从而加速机体的新陈代谢。若机体肾阳虚衰,则会引起推动及温煦等作用的减退,则进一步引起脏腑机能的减退,造成精血津液化生和运行输布功能的减弱,引起虚寒内生的病理变化。目前肾阳虚者的典型临床表现多为畏寒肢冷、腰膝酸软、性欲减退和精神萎靡等肾阳虚衰症状,如未能及时治疗,阳损及阴,则可能会导致阴阳两虚证,甚至出现虚劳的表现^[13-14]。肾阳虚症状现多以温补肾阳为主要治法,因此使用温补肾阳的药物可以有效缓解环磷酰胺引起的指标异常。目前,肾阳不足、肾虚等肾阳虚症状的治疗多采用桂附地黄丸^[9]、金匮肾气丸^[15]与济生肾气丸^[16]等助阳中药。蒋平^[17]等研究发现金匮肾气丸能有效改善血细胞的异常。冯璞^[15]、贝红霞^[18]等研究发现金匮肾气丸的使用在促进造血功能恢复与肾功能状态改善时起到了显著的作用。白娜^[16]研究发现,通过济生肾气丸的服用,可以有效的治疗肾阳虚肾炎疾病。而桂附地黄丸作为温肾补阳的经典名方之一,具有改善肾脏功能、增强机体免疫力等作用,目前已广泛应用^[19]。有研究表明,其药方中的肉桂有抗肿瘤、抗菌和抗炎等多种药理作用,附子具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛等功效,熟地黄具有增强免疫、抑制肿瘤生长和改善肾功能等作用,山茱萸具有免疫调节和肾脏保护等作用,牡丹皮可以清热凉血、活血化瘀,山药具有补中益气、调节脾胃的作用,同时山药多糖具有免疫调节和增强白细胞吞噬的作用^[20-25]。马艳春等^[26]研究发现,茯苓多糖通过增强细胞和体液免疫进而增强机体免疫功能,对免疫系统、免疫组织、免疫器官均有一定保护作用,同时茯苓多糖具有较好的抗炎、抗病毒和抗肿瘤等作用。张维君等^[27]研究发现,泽泻也具有抗炎和增强免疫的功效。

研究表明GDT与CTX的小鼠相比,其单核细胞总数、中性粒细胞总数、中性粒细胞百分比、平

均红细胞血红蛋白含量、平均红细胞血红蛋白浓度得到了显著提升,淋巴细胞百分比显著下降,说明桂附地黄丸改善了环磷酰胺引起的血细胞异常。其中,单核细胞能吞噬异物从而使机体产生抗体,同时中性粒细胞具有趋化、吞噬和杀菌的功能^[28],进一步说明了桂附地黄丸可以提高机体的免疫力,这可能与药方中的熟地黄、山茱萸、山药、茯苓和泽泻有关。本研究还表明,与CTX相比,GDT小鼠的谷草转氨酶含量显著下降,而肌酐含量得到了显著的提升,而谷草转氨酶与肌酐是评价肾功能的重要指标,即桂附地黄丸的使用可以在一定程度上调节环磷酰胺引起的肝肾功能变化,这可能与药方中的附子、熟地黄等有关。但如何在临床上有效使用桂附地黄丸改善环磷酰胺引起的血常规与血清生化指标的异常仍有待进一步研究。

综上所述,桂附地黄丸对环磷酰胺导致的血常规和血清生化指标的异常有显著的改善作用,尤其是在血细胞和肝肾功能方面有明显的效果,可以为临床治疗用药提供参考。

参考文献:

- [1] 曾红梅,陈万青.中国癌症流行病学与防治研究现状[J].化学进展,2013,9(9):1415-1420.
- [2] Zhang Z, Pan T, Liu C, et al. Cyclophosphamide induced physiological and biochemical changes in mice with an emphasis on sensitivity analysis[J].Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021,211:111889.
- [3] 孙晓歌,厉小梅,李向培,等.环磷酰胺联合小剂量沙利度胺对HLA-B51 阴性/阳性白塞病患者血液流变学的影响[J].药物评价研究,2021,44(12):2635-2640.
- [4] Ahlmann M,Hempel G.The effect of cyclophosphamide on the immune system:implications for clinical cancer therapy[J].Cancer Chemother Pharmacol,2016,78(4):661-671.
- [5] 胡建,胡忠泽.壮腰健肾丸对免疫抑制小鼠血常规和血清生化指标的影响[J].右江民族医学院学报,2021,43(4):460-464.
- [6] 郭肖,雄秋多吉,桑杰卓玛,等.雪山杜鹃多糖对环磷酰胺致免疫低下雄性小鼠肝肾组织的保护作用[J].高原科学研究,2021,5(1):44-48.
- [7] 蔡涛,尤耀东,张磊,等. Cdy1、G9a、及HDAC1 在肾阳虚大鼠睾丸组织中的表达[J].成都医学院学报,2017,12(4):449-453.
- [8] 郭玉洁,马跃,黄琳.桂附地黄丸对小鼠肝组织TLR2 与C8α基因表达的影响[J].中医药临床杂志,2018,30(7):1232-1236.
- [9] 陈嵘,秦竹,吴施国,等.桂附地黄丸对肾阳虚抑郁症大鼠行为学改变的影响[J].新中医,2013,45(4):165-168.
- [10] 高敏,侯衍豹,杨勇,等.不同条件环磷酰胺建立小鼠免疫力低下模型的比较及偏最小二乘法(PLS)数学建模分析[J].中国比较医学杂志,2015,25(9):62-69.
- [11] 韦凤华.环磷酰胺临床应用研究进展[J].中国药事,2013,27(3):324-326.
- [12] 王怡菲,曹楠,许丹宁,等.不同剂量环磷酰胺对昆明小鼠肝肾组织的损伤作用研究[J].中国畜牧兽医,2021,48(2):695-703.
- [13] 杨世文,吴国伟.桂附地黄丸联合索利那新治疗老年良性前列腺增生合并膀胱过度活动症的效果[J].河南医学研究,2021,30(17):3209-3211.
- [14] 陆世广,李静,张亚方,等.中国劲酒缓解肾阳虚证患者主要症状的临床观察[J].中成药,2018,40(3):562-570.
- [15] 冯璞,罗崇念,邓友平,等.金匱肾气丸对免疫缺陷小鼠免疫造血功能的影响[J].中药药理与临床,1998(1):9-11.
- [16] 白娜.济生肾气丸治疗脾肾阳虚型慢性肾小球肾炎的临床效果分析[J].中国医药指南,2016,14(26):200-201.
- [17] 蒋平,钟枝梅,张亮,等.金匱肾气丸对环磷酰胺造模小鼠血常规的影响[J].井冈山大学学报:自然科学版,2020,41(1):97-101.
- [18] 贝红霞,姜聪娇,甘辉.金匱肾气丸对肾性高血压伴蛋白尿患者血清白蛋白及血脂水平的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2020,21(10):878-880.
- [19] 郭玉洁,马跃,黄琳.桂附地黄丸对小鼠肝组织TLR2 与C8α基因表达的影响[J].中医药临床杂志,2018,30(7):1232-1236.
- [20] 高铭哲,李婷,田晨琪,等.肉桂化学成分与药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2021,17(11):201-205.
- [21] 马文竹.从药师角度浅谈毒性中药附子的合理应用[J].光明中医,2021,36(7):1022-1024.
- [22] 倪炯臣,张伟.熟地黄的量效关系及临床应用[J].湖北中医杂志,2021,43(12):41-45.
- [23] 刘洪,许惠琴.山茱萸及其主要成分的药理学研究进展[J].南京中医药大学学报,2003,19(4):254-256.
- [24] 刘琪琪,王春柳,支文冰,等.基于网络药理学和分子对接技术探讨药对赤芍-牡丹皮治疗银屑病的作用机制[J].世界中医药,2021,16(14):2061-2066.
- [25] 杨宏莉,李少春,张伟伟,等.山药多糖的药理作用[J].医学研究与教育,2010,27(3):80-82.
- [26] 马艳春,范楚晨,冯天甜,等.茯苓的化学成分和药理作用研究进展[J].中医药学报,2021,49(12):108-111.
- [27] 张维君,韩东卫,李冀.泽泻的化学成分及药理作用研究进展[J].中医药学报,2021,49(12):98-102.
- [28] 高继鑫.小鼠B 淋巴细胞吞噬功能研究[D].西安:第四军医大学,2012.