

● 论著 ●

清热解毒方对可移植性小鼠微小残留白血病实验研究

王欣¹ 褚建新² 傅汝林³ 赵钧铭²

(1 中国中医研究院西苑医院 北京 100091; 2 中国医学科学院血液学研究所 天津 300020; 3 贵阳中医学院一附院 贵阳 550001)

摘要:目的:探讨清热解毒方对微小残留白血病模型的疗效、作用机制,并就其对 2 种不同肿瘤负荷的疗效进行比较。方法:造模成功后予高剂量清热解毒方灌胃 7d,观测生存时间、外周血白细胞计数及分类、骨髓有核细胞涂片分类、肝脾指数、肝脾骨髓病理形态、残留白血病细胞、细胞增殖周期及细胞凋亡。结果:清热解毒方可延长微小残留白血病小鼠的生存时间($P < 0.05$),且肿瘤负荷较小时疗效较好。结论:清热解毒方对微小残留白血病有效。减轻白血病细胞对脏器的浸润、抑制 MRL 小鼠骨髓细胞的增殖活力、促进细胞凋亡,这可能是该方部分作用机制。

关键词:清热解毒方;微小残留白血病模型;实验研究;生存时间;流式细胞术;细胞周期;细胞凋亡;肿瘤负荷

Abstract: Objective: To evaluate the therapeutic effect of Qingre Jiedu Recipe (QRJDR) on minimal residual leukemia (MRL) model, explore its mechanism and compare the effect of QRJDR on two different tumor cell burden of the model. Methods: the established model mice were treated with high dosage of oral QRJDR for 7 days. Then their survival time, leukocyte count in peripheral blood and bone marrow, liver and spleen index, pathological study of the liver, spleen and bone marrow, residual leukemic cells, cell cycle and apoptosis were observed. Results: QRJDR could prolong the survival time of model mice ($P < 0.05$) and the effect was better when tumor cell burden was lower. Conclusion: QRJDR was effective on MRL and the effect was better when tumor cell burden was lower. QRJDR could lower the organ leukocyte infiltration, inhibit the proliferation of bone marrow cells of model mice and induce apoptosis which might be partial mechanism of QRJDR.

Key words: Qingre Jiedu Recipe; Minimal residual leukemia; Survival time; Flow cytometry; Cell cycle; Apoptosis; Tumor cell burden

中图分类号: R 733.71

文献标识码: B

文献编号: 1671-4040(2004)05-0001-03

化疗作为目前治疗急性白血病(以下简称“急白”)的基本手段,近年来已有长足进展,但由于其不能彻底杀灭肿瘤细胞,故终究难免复发,因此,抗复发成为当前“急白”治疗研究的重点和难点。贵阳中医学院近 30 年来以清热解毒方辨证加减单用或配合化疗治疗“急白”取得了较好的疗效^[1-5]。为观察该方对微小残留白血病(minimal residual leukemia, MRL)的疗效、作用机制,并就其对 2 种不同肿瘤负荷的疗效进行比较,进行实验研究如下。

1 材料

1.1 药品和试剂 清热解毒方(由水牛角、生地、生石膏、柴胡、地骨皮、鳖甲、龟版、金银花、连翘、蒲公英、白花蛇舌草、半枝莲、大青叶、桃仁、红花组成)。常规水煎,其中水牛角、鳖甲、龟版先煎,制成所需浓度的药液备用。上述中药饮片均购自北京同仁堂。环磷酰胺(CTX,上海华联制药有限公司生产,批号 991101)。碘化丙啶(PI)。

1.2 动物 615 近交系小鼠,鼠龄 5~8 周,体重 18~24 g,雌雄各半,购自中国医学科学院肿瘤所。

1.3 仪器 流式细胞仪(美国 BECTON DICKINSON 公司 FACS Calibur 型)。

1.4 L₇₂₁₂ 白血病细胞株 由中国医学科学院血液学研究所提供。

2 方法

2.1 模型的建立 按文献^[6]所述,造成可移植性小鼠白血病微小残留病模型。

2.2 分组及给药方法 将 615 小鼠随机分为正常对照组、L₇₂₁₂ 模型组、MRL 模型组、MRL 中药 I 组(中药高剂量)。MRL 中药组于接种后 4d 起予清热解毒方(高剂量中药含生药 7.34g/mL) 0.3mL/只灌胃,1 次/d,连续 7d。正常对照组和 L₇₂₁₂ 模型组于接种后 1d 起、MRL 模型组于接种后 4d 起予生理盐水,剂量、用法、疗程同前。

2.3 观测指标

2.3.1 生存时间 用公式 $(T-C)/C \times 100\%$ 计算其生命延长率(T 为治疗组平均生存天数, C 为对照组平均生存天数)。

2.3.2 外周血白细胞计数及分类

2.3.3 骨髓有核细胞涂片分类

2.3.4 肝、脾指数

2.3.5 肝、脾、骨髓病理形态学观察

2.3.6 残留白血病细胞的测定 采用生物移植试验^[7]检测。

2.3.7 细胞增殖周期 按文献^[8]所述,以流式细胞仪检测。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 统计软件进行统计分析。

3 结果

3.1 生存时间 第 1、2 批实验中, MRL 中药 I 组较 MRL 模

型组生存时间均有所延长, 差异有统计学意义。见表 1。

表 1 生存时间($\bar{X} \pm SD$)

实验批数	组别	n	生存时间/d	生命延长率(%)
1	L ₇₂₁₂ 模型组	6	8.3±0.5	
	MRL 模型组	6	15.9±0.7**	91.6
	MRL 中药 I 组	6	17.0±1.1*** [▲]	104.8
2 [*]	L ₇₂₁₂ 模型组	4	6.1±0.3	
	MRL 模型组	6	12.8±0.7**	109.8
	MRL 中药 I 组	7	13.6±0.7*** [▲]	123.0

注: # 第 2 批实验中接种 L₇₂₁₂ 白血病小鼠脾细胞 5.2×10⁷/只; 与 L₇₂₁₂ 模型组比较, *P<0.05, **P<0.01; 与 MRL 模型组比较, [▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01; 下同。

3.2 外周血白细胞计数及分类 MRL 模型组和 MRL 中药 I 组小鼠外周血白细胞数在接种后 6d 降至最低, 4d 基本恢复至原水平, 15d 已明显升高, 2 组间无统计学差别。接种后 11d 2 组小鼠外周血涂片中已可见少量白血病细胞, 分类结果表明后者白血病细胞的百分比低于前者, 但差异无统计学意义。接种后 15d 已可见大量白血病细胞, 分类结果同 11d。

3.3 骨髓有核细胞涂片分类 接种后 11d MRL 模型组和 MRL 中药 I 组小鼠骨髓有核细胞涂片中已可见少量白血病细胞, 分类结果表明后者白血病细胞的百分比低于前者, 但差异无统计学意义。

3.4 肝、脾指数 接种后 11d 活杀的 MRL 模型组和 MRL 中药 I 组小鼠 (2 批, 共 14 只) 及白血病死亡小鼠 (3 批, 共 47 只) 的肝、脾指数 MRL 模型组和 MRL 中药 I 组组间比较均无统计学差别。

3.5 肝、脾、骨髓病理形态学观察 接种后 11d 活杀的 MRL 模型组和 MRL 中药 I 组小鼠骨髓增生活跃, 白血病细胞形态上难以辨认; 肝、脾均可见不同程度的白血病细胞浸润, 后者脏器浸润程度较前者为轻。

3.6 残留白血病细胞的测定 MRL 模型组 -II 与 MRL 中药 I 组 -II 小鼠生存时间比较无统计学差别。

3.7 细胞增殖周期 MRL 中药 I 组较正常对照组小鼠骨髓细胞的 G0+G1 期比例高 (P<0.05), G2/G1 比值低 (P<0.01); 较 MRL 模型组小鼠骨髓细胞的 G2/G1 比值低 (P<0.05)。余者差异无统计学意义。MRL 中药 I 组小鼠骨髓细胞的凋亡比例明显高于另 2 组, 但其差异无统计学意义。见表 2。

表 2 骨髓细胞增殖周期分布($\bar{X} \pm SD$)

组别	n	计数细胞数	G0+G1(%)	S(%)	G2+M(%)	G ₂ /G ₁	凋亡细胞(%)
正常对照组	5	10 ⁴	76.94±7.69	20.03±10.28	3.03±2.89	1.96±0.10	10.12±15.55
MRL 模型组	3	10 ⁴	88.35±1.31	11.30±1.79	0.35±0.60	1.97±0.03	5.52±4.79
MRL 中药 I 组	2	10 ⁴	92.77±7.00 [▲]	7.23±7.00	0	1.55±0.30 ^{▲▲}	28.93±15.73

注: 与正常对照组比较, [▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01。

4 讨论

4.1 本实验发现, 清热解毒方对 MRL 有一定疗效, 这与临床报道的结果是一致的, 其可延长 MRL 小鼠的生存时间 (P<0.05)。提示该方对微小残留白血病的疗效是客观的。清热解毒方可降低 MRL 小鼠外周血中白细胞的数量及白血病细胞的比例。其无统计学意义可能因为采血的时间点不合适或因疗效有限。此外, 与人类白血病的复发类似, 从小鼠 MRL 发病的整个过程来看, 大致分为 3 个时期, 即白血病细胞破坏和造血抑制期、造血恢复期以及白血病细胞再增殖、

再浸润期。在发病前两期, 外周血中白细胞的数量及白血病细胞的比例 MRL 中药组与 MRL 模型组间基本无差异; 在 III 期, 白血病细胞迅速增殖和浸润, 骨髓中白血病细胞大量入血, 外周血中白细胞的数量迅速增高, MRL 中药组与 MRL 模型组间差异显著, 此时即使组间差异有统计学意义, 但已无生物学意义, 因为濒临疾病终末期, 已难以控制病情。

接种后 11d 天活杀的 MRL 中药 I 组及 MRL 模型组小鼠骨髓有核细胞涂片分类中已可见白血病细胞, 比例均较低, 前者较后者更低, 但无统计学意义。可能因为白血病细胞尚未大量增殖, 因而未能表现出清热解方毒的作用; 也可能因为该方对 MRL 的疗效是有限的。

从理论上说, 同一白血病模型小鼠死亡时的肿瘤负荷是基本一定的, 因此白血病死亡小鼠的肝脾指数也应是一定的。本实验中白血病死亡小鼠的肝脾指数 MRL 中药 I 组与 MRL 模型组间无差异, 与前述假想一致。接种后 11d 活杀小鼠的肝脾指数无差异可能因为 CTX 对脾脏、肝脏中白血病细胞作用比较充分, 在接种后 11d, 少量残留的白血病细胞未及增殖、浸润, 因而未能表现清热解方毒的作用。

病理形态学观察表明, 接种后 11d 活杀的 MRL 中药 I 组及 MRL 模型组小鼠骨髓增生程度无差别, 白血病细胞形态上难以辨别; 前者脾脏、肝脏白血病细胞浸润程度轻于后者。提示清热解方毒方能减轻白血病细胞对脏器的浸润, 对骨髓增生程度可能无影响。骨髓中白血病细胞形态上难以辨别可能与 CTX 对骨髓中白血病细胞作用比较充分, 在接种后 11d, 少量残留的白血病细胞未及增殖、浸润, 因而未能表现清热解方毒的作用有关。同时也说明残留白血病细胞在脾脏、肝脏和骨髓间的分布是不均匀的, 这与文献报道^[9]的结果是一致的。可能由于 CTX 对骨髓的疗效优于脾脏、肝脏; 或者脾脏、肝脏具有较骨髓更适于白血病细胞增殖、浸润的微环境; 或者脾脏、肝脏较骨髓中的白血病细胞具有更高的侵袭力等原因。

生物移植试验是目前残留白血病细胞检测最敏感的方法, 该方法检测的敏感性为 10⁻⁸。接种后 11d 进行此试验, MRL 中药 I 组和 MRL 模型组间残留白血病细胞检测未发现差异, 可能因为 CTX 对骨髓中白血病细胞作用比较充分, 在接种后 11d, 少量残留的白血病细胞未及增殖、浸润, 因而未能表现清热解方毒的作用。这与接种后 11d 活杀 MRL 中药组和 MRL 模型组小鼠的骨髓有核细胞涂片分类、肝脾指数及其骨髓病理形态学观察的结果是一致的。

4.2 第 1、2 批实验中, 清热解毒方对 MRL 均有一定疗效, 可延长 MRL 小鼠的生存时间 (P<0.05)。第 1 批实验中接种 L₇₂₁₂ 白血病小鼠脾细胞的数量 (1×10⁷/只) 低于第 2 批实验 (5.2×10⁷/只), 这可能是前者生命延长时间长于后者的原因。说明其他条件不变, 肿瘤负荷较小时, 清热解毒方疗效较好。提示及早治疗“急白”可获得更好疗效, 这符合目前对“急白”治疗的认识^[10,11]。

4.3 本实验采用 PI 进行核酸染色, 以流式细胞术对各组小鼠骨髓细胞核 DNA 含量的测定发现, MRL 模型白血病细胞 G0+G1 比例高于正常骨髓细胞, S、G2+M 及凋亡细胞比例低于正常, 但无统计学意义。说明 MRL 细胞与正常骨髓细胞在

sCD14 和 sTNFR-P55 治疗严重烫伤小鼠胰岛素抵抗和胰岛素分泌障碍实验研究

王占科 胡新勇 柴长春 冯青青 杨莉萍 祝仲珍

(解放军第九四医院 江西南昌 330002)

摘要:目的:观察可溶性白细胞分化抗原 14(sCD14)和可溶性肿瘤坏死因子受体 -p55(sTNFR-P55)对严重烫伤小鼠胰岛素抵抗、胰岛素分泌以及糖代谢障碍的治疗效果。方法:单项和联合静脉注射 sCD14 和 sTNFR-P55 给严重烫伤小鼠,观察不同治疗组及其对照组的死亡率、稳态模式胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和胰岛素分泌指数(HOMA-β)以及空腹血糖和乳酸含量变化。结果:烫伤小鼠各治疗组 HOMA-IR 指数、空腹血糖和乳酸含量明显低于对照组,且联合治疗组低于单项治疗组。烫伤小鼠各治疗组 HOMA-β 指数明显高于对照组($P < 0.01$),且联合治疗组高于单项治疗组($P < 0.01$)。sCD14 和 sTNFR-P55 联合治疗组烫伤小鼠死亡率明显低于治疗对照组($P < 0.05$),但其它治疗组与治疗对照组无显著差异($P > 0.05$)。结论:静脉注射 sCD14 和 sTNFR-P55 能够有效改善严重烫伤小鼠胰岛素抵抗和胰岛素相对血糖分泌功能下降以及糖代谢障碍,且联合治疗效果优于单项治疗。

关键词:sCD14; sTNFR-P55; 烫伤; 胰岛素抵抗; 胰岛素分泌; 空腹血糖; 空腹乳酸; 治疗

Abstract: Objective: In order to observe the therapeutic effect on the insulin resistance and hyposecretion of the scalded mice by treated with sCD14 and sTNFR-P55. Methods: The levels of dead rates, HOMA-IR, HOMA-β, Fasting glucose, Fasting lactic acid of the scalded mice treated individually by infusion with sCD14, sTNFR-P55, and both the sCD14 and sTNFR-P55, were examined compared with that of the control mice. Results: The levels of the HOMA-IR, Fasting glucose, Fasting lactic acid of the treated scalded mice were all lower than that of the control scalded mice, and the levels of the HOMA-β of the treated scalded mice were higher than that of the control scalded mice ($P < 0.01$). It was also found that the levels of HOMA-IR, Fasting glucose, Fasting lactic acid of the treated scalded mice with both sCD14 and sTNFR-P55, were lower than that of the treated with the single sCD14 or sTNFR-P55. The dead rate of the scalded mice treated with both the sCD14 and sTNFR-P55 was lower than that of the control scalded mice ($P < 0.05$). Conclusion: The treatments with sCD14 and sTNFR-P55 could contribute to ameliorate the insulin resistance and the insulin hyposecretion in the burned or scalded states, the therapeutic effect of the treatments with both the sCD14 and sTNFR-P55 was better than that of treatments with single one.

Key words: sCD14 s; TNFR-P55; scalded; insulin resistance; insulin hyposecretion; glucose lactic acid

中图分类号: R 644

文献标识码: B

文献编号: 1671-4040(2004)05-0003-02

sCD14 和 sTNFR-P55 分别是体内存在的内毒素(LPS)和肿瘤坏死因子 α (TNFα) 可溶性缺陷受体,通过竞争其膜受体,来抑制 LPS 和 TNFα 的病理作用。严重创伤患者 sCD14 和 sTNFR-P55 虽然升高,但分别相对 LPS 和 TNFα 不足,并与预后呈正相关^[1,2],sCD14 和 sTNFR-P55 作为治疗

严重创伤胰岛素抵抗和胰岛素分泌障碍的药物,值得研究。为此,我们以严重烫伤小鼠为创伤模型,随机分为 sCD14 治疗组、sTNFR-P55 治疗组、sCD14 和 sTNFR-P55 联合治疗组及其对照组,观察各组死亡率以及胰岛素抵抗、胰岛素分泌和糖代谢障碍相关指标的变化,为临床治疗烧、创伤糖代谢

增殖周期各时相的比例无差异,前者凋亡细胞的比例低于后者。提示小鼠 MRL 细胞无异常增殖动力学变化,其发病可能与进入增殖周期白血病细胞数量的大量增多、细胞分化及凋亡障碍有关。MRL 中药组较正常对照组 G0+G1 细胞高($P < 0.05$);较正常对照组及 MRL 模型组 S、G2+M 细胞及 G2/G1 比值低(后者 $P < 0.05$),凋亡细胞比例高(其差异无统计学意义可能因为样本容量小的缘故)。提示该组小鼠骨髓细胞增殖活力减低,凋亡细胞增多,这可能是清热解毒方部分作用机制。

参考文献

- [1]贵阳医学院附属医院.治愈急性白血病 1 例报告[J].中医杂志, 1958(11): 773
- [2]许玉鸣.治疗白血病的经验体会[J].新医学杂志, 1978(11): 11
- [3]许玉鸣.白血病中医治疗病例 3 则[J].贵阳中医学院学报, 1986(4): 20

- [4]贵阳中医学院第一附属医院内科血液组.急性白血病中药治疗 14 例小结[J].贵阳中医学院学报, 1982(3): 33
- [5]王欣,傅汝林.中药小剂量化疗并用治疗急性白血病 33 例分析[J].中医药学刊, 2003, 21(7): 1 172
- [6]褚建新,王敏,杨天樞.微小残留白血病的实验研究.中华血液学杂志, 1991, 12(8): 394
- [7]郑德先,吴克复,褚建新.现代实验血液学研究方法与技术[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999. 510
- [8]姜泊,张亚历,周殿元.分子生物学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社, 1996. 1 358
- [9]褚建新,王敏,杨天樞.微小残留白血病的实验研究[J].中华血液学杂志, 1991, 12(8): 394
- [10]艾辉胜,罗荣城,乐晓峰.现代白血病学[M].北京:人民军医出版社, 1998. 173
- [11]汤钊猷.现代肿瘤学[M].上海:上海医科大学出版社, 1993. 724

(收稿日期: 2004 - 03 - 15)