

·研究报告·

针灸对环磷酰胺化疗小鼠骨髓细胞DNA含量动态变化的影响

路玫¹, 李昆珊², 曹大明³, 李道明⁴, 赵喜新¹, 李建伟⁴

(¹河南中医药大学, 郑州 450046; ²上海中医药大学, 上海 201203; ³郑州大学基础医学院, 郑州 450001; ⁴河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450003)

摘要:目的: 通过观察针灸对环磷酰胺(CTX)化疗小鼠骨髓细胞DNA含量的影响, 探讨针灸改善化疗后骨髓抑制, 升高外周血白细胞数的分子生物学机制。方法: 将昆明种小鼠160只按体质量随机分为正常组、模型组、针刺组、艾灸组, 每组40只。用CTX建立骨髓抑制模型, 模型成功后, 每天定时对针刺组、艾灸组小鼠“大椎”“膻中”“肾俞”“足三里”给予针刺, 艾灸组行, 隔灸6d。正常组、模型组每日经同部位固定。不治疗, 摘除外周血白细胞数, 流式细胞仪检测各组小鼠骨髓细胞G₀/G₁期、S期DNA含量, 进行数据统计分析。结果: 针刺和艾灸可使CTX小鼠外周血白细胞数提前1天回升至术前1天测定基础水平, 针刺和艾灸可以上调骨髓细胞G₀/G₁期、S期DNA含量, 在治疗第5天针刺组、艾灸组骨髓细胞G₀/G₁期、S期DNA含量高于模型组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论: 针刺和艾灸可以上调CTX小鼠骨髓细胞G₀/G₁期、S期DNA含量, 加速骨髓细胞DNA的修复, 改善化疗所致骨髓细胞增殖、分裂受抑制状态, 发挥提升外周血白细胞, 维护造血功能的作用。

关键词: 环磷酰胺; 骨髓抑制; 针灸; DNA含量

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(8129009005)

Effects of acupuncture and moxibustion on DNA content during different mitotic cycles of bone marrow cells in cyclophosphamide-induced mice

LU Mei¹, LI Kun-shan², CAO Da-ming³, LI Dao-ming⁴, ZHAO Xi-xin¹, LI Jian-wei⁴

(¹Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China; ²Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

³School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; ⁴The First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450003, China)

Abstract Objective: To explore the mechanism underlying acupuncture and moxibustion improving suppression of bone marrow and periphery leucocyte by observation of effects of acupuncture and moxibustion on DNA content during different mitotic cycles of bone marrow cells in cyclophosphamide-induced mice. Methods: Total of 160 Kunming mouse were randomly divided into control group, model group, acupuncture group and moxibustion group, 40 mice in each group. The model of myelosuppression was induced by cyclophosphamide. Mice in the acupuncture group and moxibustion group were respectively given the treatment of acupuncture and moxibustion on acupoints including 'Dazhu'(GV 14), 'Geshu'(BL 17), 'Shenshu'(BL 23) and 'Zusanli'(ST 36), for 6 consecutive days. The mouse in the control group and model group were subjected only fixation but no extra treatment. The number of periphery leucocyte was recorded by microscopy. The DNA content in G₀ and G₁ phase of bone marrow cells was detected by flow cytometry. Results: The recovery of periphery leucocyte in cyclophosphamide-induced mice was advanced by the treatment of acupuncture and moxibustion for one day, and the time of when number of periphery leucocyte exceeded the basic level was advanced for one day. In the 5th day of the treatment, the DNA content of G₀ and G₁ phase in the acupuncture and moxibustion groups were higher than those in the model group, indicating that acupuncture and moxibustion increased the DNA content of G₀ and G₁ phase ($P<0.05$). Conclusion: Acupuncture and moxibustion promote DNA repairmen by up-regulating DNA content of bone marrow cells in cyclophosphamide-induced mice, improving suppression of bone marrow and periphery leucocyte and recovering hematopoietic function.

Key words: Cyclophosphamide; Suppression of bone marrow; Acupuncture and moxibustion; DNA content

Funding: General Program of National Natural Science Foundation of China (No.812900905)

通讯作者: 曹大明, 河南省郑州市郑东新区龙子湖校区河南中医药大学, 邮编: 450046。电话: 0371-55978898

E-mail: 3578595328@qq.com

骨髓抑制是化疗所致最常见、最严重不良反应之一。实验检测表现为骨髓造血功能的下降、外周血细胞数目的降低。抗肿瘤药物引起骨髓抑制最主要的原因是化疗药物缺乏特异性选择,在杀伤肿瘤细胞的同时,也作用于正常细胞增殖周期不同环节,抑制DNA合成、分裂和增殖,尤其对增殖旺盛的骨髓造血细胞损伤严重^[2]。通过抑制骨髓中血细胞合成的活性,导致血细胞数下降,其中对粒细胞影响最大。既往研究证实针灸改善化疗所致的骨髓抑制疗效确切^[3-5]。故本研究通过观察针灸对环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)化疗小鼠骨髓细胞DNA含量动态变化的影响,探讨针灸减轻CTX所致骨髓抑制的分子生物学机制。

材料与方法

1. 动物与分组 清洁级雄性昆明种(KM)小鼠180只,7月龄,体质量 (20 ± 2) g,购自河南省实验动物中心(郑州大学医学院),合格证号:SCXK(豫)2005-0001,由河南中医药大学提供清洁级动物房和实验室,在温度 $22\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度60%左右的实验环境中适应性饲养3d后,按体质量随机分为正常组、模型组、针刺组、艾灸组,每组40只。

2. 仪器 台式恒温高速离心机(江苏太仓医疗器械厂);COULTER EPICS-XL流式细胞仪(美国Coulter公司);倒置显微镜(重庆重光设备厂); CO_2 细胞培养箱(美国5E BILAS公司);超净工作台(型号:YJ-873,苏州净化设备有限公司);奥林巴斯双目光学显微镜(日本);小鼠固定板(自制);电子天平;-80℃低温冰箱;针具:华佗牌美容毫针,规格:0.9mm $\times$ 13mm,针柄20mm(苏州医疗器械用品有限公司);美容艾条,规格:0.4cm $\times$ 25cm(河南南阳陈艾制品厂)。

3. 试剂 5mg/mL的CTX溶液;PBS缓冲液;在800 μL 蒸馏水中溶解8g NaCl、0.295g CaCl_2 、1.44g Na_2HPO_4 和0.24g $\text{KH}_2\text{P}_2\text{O}_4$,用HCl调节溶液pH值至7.4,加水定容至1L,在 1515 g/cm^2 $0.094\times 10^5\text{ Pa}$ 高压下蒸汽灭菌20min,保存于室温;碘化丙啶(IPD)综合染液:PB2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.9%氯化钠溶液129.6 μL 、3NaOH 2mg、1.0% TritonX-100 0.3 μL 、枸橼酸钠200 μg 、蒸馏水至200 μL ,pH值为7.2~7.8,置4℃冰箱中避光保存备用;DNA染液:100 μg 碘化丙啶液、10 μL PBS液、2 μg RNA酶。

4. CTX化疗小鼠模型的建立 依据《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》的造模方法,用CTX建立骨髓抑制小鼠模型。每天腹腔注射CTX 100mg/kg(按照小鼠体质量0.02mL/kg用药量,腹腔注射浓度为5mg/mL的CTX溶液),后分别在24、48h再行CTX注射,即连续3d^[6],停药后4h模型形成(依据CTX药代动力学过程,4h后药物活性消失^[7])。正常组小鼠按照0.02mL/kg剂量,注入0.9%氯化钠溶液。

5. 取穴及治疗方法 小鼠穴位定位参考《实验针灸学》^[8]并参照大鼠穴位定位法取穴。“大椎”位于第七颈椎与第一胸椎间,背部正中。“脾俞”位于第七胸椎下两旁,左右各一穴;

“肾俞”在第二腰椎下两旁肋间,左右各一穴。“足三里”位于小鼠后肢膝关节后外侧,腓骨小头下的5mm处,左右各一穴。

针刺组:按照造模时间的先后顺序,在造模完成(小鼠腹腔注射CTX第3次)后4h进行针刺治疗。各组小鼠按编号顺序配对同时进行(即各组均从第1个编号开始至第8个编号结束)。每造模取1只小鼠俯卧固定于白蜡木板上,采用管式进针法,把消毒管针的塑料针管从中点剪断(23mm长),针具选用华佗牌美容毫针,进针时针尖高于针管5mm,进针深度为3mm,进针后针尾与针管上口相平(考虑到皮肤阻力,故高出进针深度2mm),穴位均采用直刺法,留针6min,每日1次,连续6d。

艾灸组:按照造模时间的先后顺序,在造模完成(小鼠腹腔注射CTX第3次)后4h施以艾灸。各组配对同时进行,每组选取1只小鼠俯卧固定于白蜡木板上,用美容艾条点燃后,在距离穴位皮肤3cm处固定悬灸,每次30min,大椎、肾俞穴为一组,脾俞、足三里穴为一组,共60min,每日1次,连续6d。

正常组、模型组,每日随同针刺组、艾灸组抓取、固定60min,不做任何治疗,连续6d。

标本制备方法

6.1 制尾采骨髓液 从造模前到治疗结束的每天早上7:30进行取材。方法是依次将正常组、模型组、针刺组、艾灸组每只小鼠断尾尾部静脉,取血10 μL /只,分别依次滴入事先准备好的300 μL 3%冰乙酸稀释液的试管中,以备检测外周白细胞计数。

6.2 取骨髓细胞制备成细胞悬液 从治疗第2天开始,每天针刺、艾灸4h后,取骨髓细胞制备成细胞悬液以备测定骨髓细胞中DNA含量。方法是从各组小鼠中随机选取8只鼠颈处处死,在超净工作台上取一侧的股骨和胫骨,刮净上面的肌肉和结缔组织,经0.9%氯化钠溶液冲洗-73%乙醇中浸泡3min-再用0.9%氯化钠溶液冲洗后,用无菌眼科小剪刀上端剪开,用3mL注射器抽取3.0 μL 的0.3%氯化钠溶液注入骨髓腔,反复2~3遍冲洗其全部骨髓细胞,离液成单个细胞悬液,将骨髓细胞悬液注入冻存管内密封好,再放入-80℃低温冰箱保存,以备检测骨髓细胞G₀/G₁期DNA含量。

指标检测方法

7.1 检测外周血白细胞 将试管中的血标本摇匀后,用玻璃棒将溶液均匀的混料从盖玻片旁滴入细胞计数板,后用光学显微镜观察细胞计数板上4个象限的白细胞数,并记录最终数据。

7.2 流式细胞分析法检测骨髓细胞G₀/G₁期DNA含量 将骨髓细胞悬液从冰箱中取出用2mL PBS液清洗2遍,每次清洗后均1500rpm离心5min,弃上清液,沉淀于4℃冰箱静置20min,充分离心,离心沉淀0.500rpm,15min,弃上清液,然后加入2mL PBS混匀,每份样品中加入DNA染液500 μL ,放4℃冰箱中染色1h,以500目筛网过滤,收集合格骨髓细胞悬液,上机检测(COULTER EPICS-XL型流式细胞仪,光源为氩

离子微发生器,功率为15aW,激发光波长为488nm),每次实验至少检测10 000个细胞的数量,检测单个细胞的5次荧光强度,每份标本重复检测3次,共计30 000个细胞。

8. 统计学方法 数据分析采用统计学软件SPSS 18.0分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计采用单因素方差分析,用Levene法进行方差齐性检验,若方差齐,两两比较采用LSD法;若方差不齐,两两比较采用Tamkone法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 各组小鼠造模情况 见表1。造模前各组小鼠脾脏白细胞数差异无统计学意义,说明各组小鼠来自同一整体。白细胞计数分布均匀,可用于实验。造模第2、3、4天接受CTX化疗的小鼠白细胞逐渐下降,与正常组比较差异有统计学意义($P<0.05$),表明化疗药物CTX抑制骨髓造血功能。损伤造血细胞的不利反应是非常明显的。提示造模成功。

2. 各组小鼠外周血白细胞计数动态变化 见表2。针刺、艾灸后的第2、3、4天,与正常组比较,模型组、针刺组和艾灸

组的白细胞计数均较低,且差异有统计学意义($P<0.05$);第3天模型组的白细胞数继续下降而针刺组、艾灸组的白细胞开始回升;第4天模型组、针刺组和艾灸组的白细胞均有回升,针刺组与艾灸组与模型组比较,白细胞计数较高,差异无统计学意义;第5天,与模型组比较,针刺组和艾灸组的白细胞计数升高($P<0.05$),已达正常水平,而模型组仍低于正常水平,二者相比差异有统计学意义($P<0.05$),表明针刺组和艾灸组可使CTX化疗小鼠白细胞提前1天回升(在第3天)并提前1天达到正常水平(在第5天),由此可见,针灸可以减轻CTX化疗小鼠骨髓抑制,提升白细胞。在第6天,与正常组、模型组比较,针刺组、艾灸组白细胞升高,差异有统计学意义($P<0.05$),针刺组与艾灸组无统计学意义。

3. 各组小鼠骨髓细胞c-myc、c-fos DNA含量变化 见表3~表4。c-myc、c-fos DNA含量的变化规律非常相近。治疗第2天,与正常组比较,模型组、针刺组、艾灸组c-myc、c-fos DNA水平均有所下降。在治疗第3天,化疗后的各组小鼠c-myc、c-fos DNA含量逐渐回升,但第4天针刺组、艾灸组c-myc、c-fos DNA含量已高于模型组。第5天,针刺组、艾灸组c-myc、c-fos DNA含量明显高于模型组,且差异有统计学意义($P<0.05$),说明针灸可以上调CTX小鼠骨髓细胞c-myc、c-fos DNA的含量,加速骨髓细胞DNA的修复。c-fos受损伤骨髓细胞DNA的修复时间,指从CTX化疗所致的细胞损伤,提高外周血白细胞。

讨论

化疗后患者骨髓抑制、白细胞减少属于中医学“虚劳”的

表1 CTX造模后小鼠外周血白细胞计数动态变化
($\bar{x}\pm s$, $n=8$, $\times 10^9/L$)

注:与正常组同期比较,^a $P<0.05$ 。

表2 针灸对CTX化疗小鼠外周血白细胞计数动态变化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$, $\times 10^9/L$)					
组别	治疗第2天	治疗第3天	治疗第4天	治疗第5天	治疗第6天
正常组	11.91 $\pm$ 3.83	13.81 $\pm$ 2.3 ^a	12.38 $\pm$ 3.53	13.38 $\pm$ 2.88	12.18 $\pm$ 3.35
模型组	1.86 $\pm$ 0.03 ^a	6.74 $\pm$ 0.39 ^a	4.66 $\pm$ 1.73 ^a	10.18 $\pm$ 3.07 ^a	11.94 $\pm$ 3.78
针刺组	2.34 $\pm$ 1.1 ^a	2.65 $\pm$ 1.95 ^a	5.28 $\pm$ 2.78 ^a	14.68 $\pm$ 3.81 ^b	21.93 $\pm$ 4.54 ^{bc}
艾灸组	2.31 $\pm$ 0.66 ^a	5.34 $\pm$ 1.84 ^a	4.82 $\pm$ 3.16 ^a	16.76 $\pm$ 3.87 ^b	17.44 $\pm$ 6.96 ^{bc}

注:与正常组同期比较,^a $P<0.05$;与模型组同期比较,^b $P<0.05$,^c下表同。

表3 针灸对CTX化疗小鼠骨髓细胞c-myc DNA含量动态变化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)					
组别	治疗第2天	治疗第3天	治疗第4天	治疗第5天	治疗第6天
正常组	118.54 $\pm$ 5.78	116.48 $\pm$ 8.61	119.14 $\pm$ 7.96	120.08 $\pm$ 7.88	119.78 $\pm$ 6.81
模型组	111.76 $\pm$ 6.66	114.91 $\pm$ 8.29 ^a	129.74 $\pm$ 6.33 ^a	94.73 $\pm$ 11.86	100.44 $\pm$ 2.93 ^a
针刺组	112.16 $\pm$ 5.71	125.81 $\pm$ 6.99	151.66 $\pm$ 4.76 ^a	188.78 $\pm$ 7.06 ^b	168.66 $\pm$ 2.38 ^a
艾灸组	109.81 $\pm$ 3.88	121.21 $\pm$ 4.49	152.45 $\pm$ 4.93 ^a	168.90 $\pm$ 6.46 ^b	162.66 $\pm$ 2.33 ^a

表4 针灸对CTX化疗小鼠骨髓细胞c-fos DNA含量动态变化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)					
组别	治疗第2天	治疗第3天	治疗第4天	治疗第5天	治疗第6天
正常组	228.41 $\pm$ 8.29	228.15 $\pm$ 9.46	236.43 $\pm$ 10.28	219.39 $\pm$ 8.37	235.93 $\pm$ 11.99
模型组	229.09 $\pm$ 12.98	245.63 $\pm$ 12.98 ^a	264.18 $\pm$ 12.96 ^a	183.46 $\pm$ 22.23	197.89 $\pm$ 6.74 ^a
针刺组	229.84 $\pm$ 12.27	239.69 $\pm$ 14.43 ^a	265.18 $\pm$ 17.35 ^a	214.25 $\pm$ 14.39 ^b	198.12 $\pm$ 10.88 ^a
艾灸组	215.91 $\pm$ 7.48	227.51 $\pm$ 19.94 ^a	257.68 $\pm$ 9.67 ^a	206.49 $\pm$ 12.69 ^a	197.83 $\pm$ 2.47 ^a

高时,以阳虚功能为主,气血两虚虚脱,久虚不复成为主要病机。病变涉及五脏,尤以脾胃为主,治疗时应重视补益脾胃,唯有先后天之本不耗,才能促进五脏新机的恢复,足三阴既为足阳明胃经的合穴,又是脾经之下合穴,具有健脾、补气血之功;胃俞为足太阳膀胱经之背腧穴,是胃气输注于腰部之处,具有温补脾胃、益精填髓之效;大椎为诸脉之穴,乃诸阳之会,具有振奋阳气、扶正祛邪之能;膈俞为八会穴之血会,可养血活血,擅治血分之疾。四穴合用,共奏补胃健脾、益气健脾、益精养血之功。

CTX抗恶性肿瘤的药理机制在于和细胞中的亲核基团发生烷化反应,破坏DNA的结构与功能,其作用靶点在细胞DNA^[2]。细胞DNA的合成一般是周期性的,从一次细胞分裂到下一次细胞分裂所经历的时间,为1个细胞周期。细胞周期划分为间期、有丝分裂期和细胞分裂期,间期包括3个主要阶段,是相对DNA合成而言,G₀期为DNA合成前期,S期为DNA复制期,G₂期为DNA合成期之后一直到有丝分裂,G₂期为DNA合成做好了准备工作,G₂期细胞复制完成并即将进行有丝分裂^[3]。可见S、G₂期在细胞合成中发挥至关重要的作用,细胞核DNA含量的高低反映其细胞增殖活性,DNA含量增高,细胞增殖分裂旺盛;降低则表明增殖分裂受到抑制^[4]。这提示骨髓细胞DNA含量与骨髓细胞总数密切相关,它代表着机体抗化学损伤的能力。虽然CTX是一种非特异性细胞周期毒药物,但CTX对G₂期细胞作用更强烈,其次是G₁期,对S期敏感性最低^[5-7]。CTX注入小鼠腹腔4h内,很快便可将骨髓中处于增殖期的各种血细胞杀灭或部分杀灭(取决于CTX的剂量),白细胞在外周血的寿命短,其需要骨髓中的干细胞不断补充^[8],故CTX的杀灭作用首先通过外周血白细胞反映出来,小鼠注入CTX后外周血白细胞总数依骨髓中成熟储备池的白细胞向血液释放得以维持,由于增殖池向成熟储备池的补充能力下降,外周血白细胞数无限之水越来越少,逐渐降低。由于增殖池血细胞的减少,机体反馈性调节处于静止G₀期的造血干细胞进入增殖期,以补充各系造血细胞,进而向各系成熟细胞过渡^[9],故本课题以外周血白细胞计数的动态变化、G₂期与G₁期骨髓细胞DNA含量为检测指标探讨针灸改善骨髓抑制的分子生物学机制。

本研究显示接受CTX化疗后的小鼠骨髓细胞G₂期、S期DNA含量在第3、4天不断增加,反映骨髓造血干细胞处于小鼠机体内部的自身细胞周期修复阶段,表现出抗化疗损伤的状态。齐丽娟等^[24]采用低剂量CTX多次注射已经验证了小鼠可以启动自身修复机制进行代偿性恢复。随着药物的代谢,药效的消失,第5天这种自身的细胞修复作用也随之消失,所以,第5天

恢复至G₂期、G₁期DNA含量降低,提示抗化疗损伤自我修复机制减退。呈现了化疗后损伤结果,但针灸治疗组在治疗第5天,并没有呈现典型型的修复机制减退,G₂期、G₁期骨髓细胞DNA含量降低的结果,其DNA含量与正常组接近,说明针灸可以启动细胞周期调控机制,以修复受损的细胞DNA,促进细胞DNA的合成和分裂,从而发挥抗化疗损伤的修复作用。

总之,CTX损伤骨髓细胞后,干扰了正常的细胞周期规律,影响了细胞DNA合成和细胞的有效分裂。本研究表明,针灸可以改善骨髓细胞这种增殖、分裂的抑制状态,加速DNA的修复,提高G₂期、G₁期骨髓细胞DNA的含量,促进DNA合成和有丝分裂,从而提高骨髓细胞抗化疗损伤的修复能力,升高外周血白细胞,因此,促进骨髓造血干细胞DNA修复,也应该是针灸改善骨髓抑制、保护造血功能、提升白细胞的关键环节之一。

参考文献

- [1] 许秋霞,杨艳艳,徐淑萍,等.对环磷酰胺D₅-1226所致小鼠骨髓抑制的保护作用.中国实验方剂学杂志,2010,12(2):245-249
- [2] 杨西,丁勤能,王玲玲,等.针灸治疗骨髓化疗毒副作用研究综述.中国中医药,2014,23(5):692-696
- [3] 赵喜新,王和平,田开宇,等.针灸抗化疗骨髓抑制所致白细胞减少机制研究综述.针刺研究,2003,28(3):70-78
- [4] 中华人民共和国卫生部药政局.新药 药临床前研究指导原则汇编,1993:103
- [5] 中山医学院等编著.药理学.北京:人民卫生出版社,1979:221
- [6] 郭义.实验针灸学.北京:中国中医药出版社,2008:414-415
- [7] 杨宝峰.药理学.8版.北京:中国卫生出版社,2013:437
- [8] 药立波.医学分子生物学.3版.北京:人民卫生出版社,2008:69
- [9] 蒋红松,杨林,禹正杨,等.骨髓细胞增殖DNA含量细胞增殖活性的定量分析与临床意义.中国现代医学杂志,2012,22(8):68-72
- [10] 古塞努尔·买买提,彭安,郑艳波,等.环磷酰胺化疗所致骨髓抑制中药药膳九干煎研究.北京中医药大学学报(自然科学版),2015,48(4):482-484
- [11] 贾亮亮,袁伟,金桂兰.地榆升白片对环磷酰胺致小鼠骨髓抑制的拮抗作用.中国实验方剂学杂志,2012,18(4):251-253
- [12] 徐尚福,杨天华,吴芹,等.黄芩多糖对环磷酰胺引起小鼠骨髓抑制后造血功能的修复作用.遵义医学院学报,2011,34(6):473-476
- [13] 赵喜新,白杜海,王和平,等.环磷酰胺引起的小鼠白细胞减少模型及动力学分析.上海实验动物科学,1998,18(1):12-14
- [14] 齐丽娟,宋雁,王伟,等.用环磷酰胺建立小鼠免疫抑制动物模型.卫生研究,2010,39(3):313-325

(收稿日期:2015年7月20日)