·临床检验研究论著·

艾叶多糖对促红细胞生成素体内作用的影响*

李仲娟[1,2]，杨朝令[1]，喻　昕[1]，喻格书[1]，汪宏良[2]
（1. 湖北理工学院医学院，湖北黄石 435003；2. 黄石市中心医院，湖北黄石 435000）

摘　要：目的　探讨艾叶多糖（APS）对促红细胞生成素（EPO）小鼠体内作用的影响。**方法**　煌焦油蓝染色法计数网织红细胞（Ret）数量，血细胞分析仪检测平均血红蛋白含量（MCH）。**结果**　小鼠年龄对 EPO 的作用影响较大，90 d 以上小鼠 EPO 的作用效果较为稳定；EPO 对脾脏的刺激作用受 APS 影响较大；MCH 可间接评价不同脏器对 EPO 作用的敏感性。**结论**　APS 能促进 EPO 对脾脏和肝脏作用，Ret 计数和 MCH 可用于评价 EPO 的作用。

关键词：艾叶多糖；　促红细胞生成素；　网状细胞；　平均血红蛋白
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.008　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2012)18-2193-01

Influence of Artemisia argyi polysaccharide on the in vivo effects of erythropoietin*

Li Zhongjuan[1,2], *Yang Chaoling*[1], *Yu Xin*[1], *Yu Geshu*[1], *Wang Hongliang*[2]
(1. *School of Medicine, Hubei Institute of Technology, Huangshi, Hubei* 435003, *China*; 2. *Huangshi Central Hospital, Huangshi, Hubei* 435000, *China*)

Abstract: Objective　To explore the influence of Artemisia argyi polysaccharide (APS) on the in vivo effects of erythropoietin (EPO) in mice. **Methods**　Brilliant cresyl blue staining was used to count the number of reticulocytes (Ret). Automatic blood cell analyzer was used to detect mean corpuscular hemoglobin (MCH). **Results**　The effects of EPO were influenced by age of mice, which could be stable after 90 days old. Effects of EPO on spleen might be more sensitive to the influence of APS. MCH could be used for the evaluation of the sensitivity of target organs to EPO. **Conclusion**　APS could enhance the effects of EPO on spleen and liver. Ret counting and MCH could be used to evaluate the effects of EPO.

Key words: Artemisia argyi polysaccharide;　erythropoietin;　reticulocyte;　mean corpuscular hemoglobin

促红细胞生成素（EPO）在胚胎时期主要由肝产生，成人 90%以上的 EPO 由肾脏产生，动物试验证明在许多系统疾病中均有 EPO 作用靶点[1]。EPO 也可广泛应用于各种贫血的治疗。有报道指出，EPO 会导致某些血液生理生化指标的改变[2-4]。本研究通过检测肝脏、血液和脾脏中网织红细胞（Ret）和平均血红蛋白含量（MCH）探讨艾叶多糖（APS）对 EPO 的影响。

1　材料与方法

1.1　试验动物　清洁级 C57BL/6 纯系小鼠，雄性，8 周龄，体质量 18～22 g[武汉大学试验动物学部提供，许可证号 SCXK（鄂）2008-0004]，按年龄（30、60、90、120 d）分为 4 组，各年龄组又随机分为溶剂对照组、EPO 组、APS 组和 APS＋EPO 组，每组 4 只。

1.2　仪器与试剂　重组人促红细胞生成素（rhEPO）注射液（沈阳三生制药股份有限公司），APS 由本实验室制备，无水乙醇（分析纯，天津凯通化学试剂有限公司），血细胞稀释液（济南兰洁生物技术有限公司），质控物（美国伯乐），灿烂甲酚蓝（美国 Sigma）。1800i 血细胞分析仪（日本 Sysmex）。

1.3　方法　小鼠按分组分别注射 EPO、APS 或生理盐水（NS），4 d 后断颈处死小鼠，采集血液标本 0.5 mL 于抗凝管中备用，常规解剖法打开小鼠腹腔，取出肝脏和脾脏于细胞稀释液，用手术剪剪碎脏器后 4 500 r/min 离心 3 min，收集洗液，制备细胞浓度为 5×10^9/L 的细胞悬液备用。取血液及肝脏、脾脏细胞悬液各 50 μL 与灿烂甲酚蓝染液 1∶1 混匀，室温染色 15 min，制作血膜片后自然干燥，显微镜下观察计数 Ret[5]。取血液及肝脏、脾脏细胞悬液，以 1800i 血细胞分析仪检测红细胞计数（RBC）及 MCH。

1.4　统计学处理　采用 SPPS14.0 统计学软件，以单样本 t 检验对各组数据进行比较，显著性检验水准为 $\alpha=0.05$。

2　结　　果

2.1　NS 处理小鼠外周血 Ret 计数　不同年龄组小鼠外周血 Ret 检测结果见图 1，90 d 组与 120 d 组比较无统计学意义（$P>0.05$），30 d 组、60 d 组和 90 d 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。

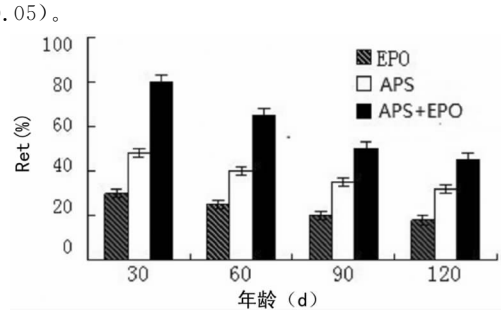

图 1　不同年龄小鼠外周血 Ret 计数

2.2　肝脏、脾脏、血液 Ret 计数　90 d 组小鼠肝脏、脾脏、血液 Ret 计数结果见图 2，APS＋EPO 组血液、肝脏、脾脏 Ret 计数结果均高于高于 APS 组或 EPO 组（$P<0.05$）。

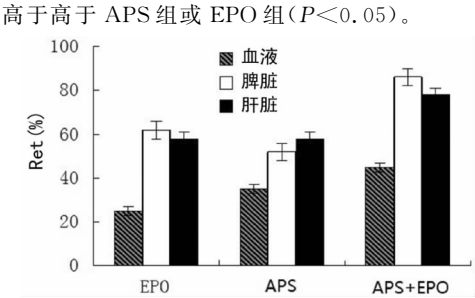

图 2　90 d 组小鼠肝脏、脾脏、血液 Ret 计数

（下转第 2195 页）

*　基金项目：黄石理工学院创新团队项目（201025）。

RPC 进行了双盲法前瞻性研究，发现接受诱导化疗的 AL 患者自化疗第 22 天可出现外周血 PLT 水平的自行恢复，而 RPC 的恢复比 PLT 提前 2 d，认为在化疗期间对 AL 患者进行 RPC 监测更有意义，能提示诱导或强化治疗后骨髓造血功能的恢复，并能减少化疗患者预防性输注 PLT 的次数，甚至建议重新修订 AL 患者预防性输注 PLT 的外周 PLT 计数临界值。国内研究也发现自体干细胞移植患者 RPC 下降先于 PLT，而在骨髓造血恢复期，RPC 增加比 PLT 计数水平增加提前 4 d[12]。

外周血和骨髓穿刺检查结果是主要的 AL 诊疗依据，但化疗后 PLT 动力学变化非常快，目前尚没有相关指标能够预示化疗后 PLT 恢复程度。本次试验显示，AL 患者 RP% 和 RPC 均低于健康者，临床缓解 AL 患者 RP% 和 RPC 上升，且与健康者比较没有统计学差异，而未缓解 AL 患者 RP% 和 RPC 水平上升不明显。

综上所述，RP 能提示诱导或强化治疗后骨髓造血功能的恢复，通过监测 AL 患者外周血 RP% 及 RPC 水平，可减少接受化疗的 AL 患者预防性输注 PLT 的次数，减轻患者经济负担，并为临床提供有意义的依据。

参考文献

[1] Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic patients[J]. Blood, 1990, 75(2): 116-120.

[2] Saxon BR, Mody M, Blanchette VS, et al. Reticulated platelet counts in the assessment of throm bocytopenic disorders[J]. Acta Paediatr Suppl, 1998, 424(1): 65-70.

[3] Takubo T, Yamane T, Hino M, et al. Clinical significance of simultaneous measurement of reticulated platelets and large platelets in idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Haematologia (Budap), 2000, 30(3): 183-192.

[4] Robinson MSC, Mackie IJ, Khair K, et al. Flowcytometric analysis of reticulated platelet: evidence for a large proportion of non-specific labeling of dense granules by fluorent dyes[J]. Br J Haematol, 1998, 100(2): 351-357.

[5] Bonan JL, Rinder HM, Smith BR. Determination of the percentage of thiozole orange(TO) positive reticulated platelets using autologous erythrocyte TO fluorescence as an internal standard[J]. Cytometry, 1993, 14(4): 690-695.

[6] Schimitz G, Rothe G, Ruf A, et al. European group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flowcytometric characterization of platelet function[J]. Thromb Haemost, 1998, 79(7): 885-896.

[7] 向晓娟，邓承祺，牛挺，等. 流式细胞术检测网织血小板[J]. 中华血液学杂志，2000，21(9)：501-502.

[8] 张之南. 血液病诊断和疗效标准[M]. 2 版. 北京：科学出版社，1998：34-35，258-280，431-432.

[9] 杨玉琮，程小丽，陈葳. CyFlowSpace 流式细胞仪 $CD34^+$ 细胞绝对计数分析[J]. 国际检验医学杂志，2011，32(13)：1471-1473.

[10] 苏丽. 血小板输注在白血病化疗中的应用[J]. 国际检验医学杂志，2011，32(10)：1145.

[11] Stohlawetz P, Stiegler G, Knobl P, et al. The rise of reticulated platelets after intensive chemotherapy for AML reduces the need for platelet transfusions[J]. Ann Hematol, 1999, 78(2): 271-273.

[12] 陈兵，欧阳健，陈军浩. 网织血小板与造血干细胞移植后再造血重建的相关性研究[J]. 江苏医药杂志，2003，29(5)：751-752.

（收稿日期：2012-02-12）

（上接第 2193 页）

2.3 血液、肝脏、脾脏 MCH 检测　90 d 组小鼠肝脏、脾脏、血液 MCH 检测结果见图 3，不同处理组血液、脾脏和肝脏 MCH 检测结果组内比较差异无统计学意义（$P>0.05$），但 APS＋EPO 处理组血液、脾脏和肝脏 MCH 检测结果与 EPO 组和 APS 组比较差异有统计学意义，且 APS＋EPO 组、APS 组、EPO 组检测结果与 NS 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。

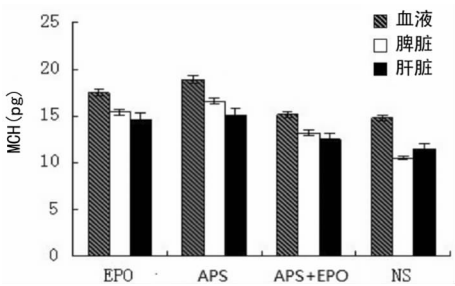

图 3　90 d 组小鼠肝脏、脾脏、血液 MCH 检测结果

3 讨　论

EPO 是调节红细胞生成的主要因子，靶器官包括骨髓、肝脏和脾脏。多糖类物质可直接和（或）间接诱导造血微环境中的基质细胞、淋巴细胞等分泌造血生长因子，如集落刺激因子（CSF）、白细胞介素（IL）-23、IL-26，EPO 等，进而促进造血干祖细胞的增殖、分化[6]。体内 EPO 含量与运动、血液 pH 值及年龄等因素有关[7]。外周网 Ret 计数通常用来判断骨髓红细胞系统的造血情况，或用来鉴定各种贫血，而 MCH 也可用于贫血的鉴别[3,8]。

本研究利用动物模型，通过比较外周血及 EPO 靶器官 Ret 数量，评价了 APS 对 rhEPO 的作用和影响，为阐明 APS 对红细胞系统成熟的促进作用提供了理论依据。本研究结果（图 1）显示，APS 和 EPO 对成年小鼠的影响作用稳定。Ret 计数在反映骨髓红细胞系统造血能力方面很敏感。根据本研究结果（图 2），笔者认为 EPO 靶器官 Ret 计数超过 50% 即有研究意义。作为长期监测红细胞的指标，本研究结果（图 3）说明 MCH 也可用于 EPO 或 APS 药理作用评价，且监测成本低于免疫学检测定量技术。本研究通过分析 Ret 计数和 MCH，为探索 APS 对 EPO 在小鼠体内作用的影响提供科学依据。

参考文献

[1] Tong EM, Nissenson AR. Erythropoietin and anemia[J]. Semin Nephrol, 2001, 21(2): 190-203.

[2] Birkeland KI, Stray-Gundersen J, Hemmersbach P, et al. Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance[J]. Med Sci Sports Exerc, 2000, 32(7): 1238-1243.

[3] Breymann C. Erythropoietin test methods[J]. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2000, 14(1): 135-145.

[4] Birkeland KI, Hemmersbach P. The future of doping control in athletes issues related to blood sampling[J]. Sports Med, 1999, 28(1): 25-33.

[5] 叶应妩，王毓三，申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京：东南大学出版社，2006：130-132.

[6] 周国华，于国萍. 黑木耳多糖降血脂作用的研究[J]. 现代食品科技，2005，21(1)：46-48.

[7] 刘志贤，李剑鸿，曾建武. 新生儿网织红细胞计数参考范围的探讨[J]. 生物医学工程与临床，2008，6(12)：487-489.

[8] 周建中. 红细胞参数在缺铁性贫血诊断中的应用评价[J]. 国际检验医学杂，2006，32(7)：805-806.

（收稿日期：2012-04-01）