

第七届全国中西医结合血液病 学术会议 论文集



中国中西医结合血液学专业委员会

昆明·2004年9月

陕药广审(文)第2004020069
批准文号: 国药准字Z20026566

重燃生命希望!

唯一获得SFDA批准治疗白血病的纯天然药物

解毒维康片

根据中医系统疗法、辩证施治理论, 有效治疗白血病。

- > 迅速改善贫血、发热、出血及肝脾、淋巴肿大症状;
- > 有效杀灭白血病细胞, 提高完全缓解率;
- > 促进人体造血组织正常造血机能的恢复;
- > 克服多药耐药的治疗问题, 有效预防缓解后的复发;
- > 提高患者对放、化疗药物的耐受性, 改善患者的生存质量。



用于放、化疗期间的联合治疗及放、化疗后的巩固维持治疗, 包括对放、化疗产生耐药的难治型白血病的临床治疗。

- 【功能主治】 清热解毒, 补益肝肾。用于白血病热毒壅盛, 肝肾不足证及放疗和化疗引起的血细胞减少等症。
- 【用法用量】 口服, 一次3片, 一日3次。
- 【注意事项】 定期复查血象。

请按医生处方购买和使用



西安恒生堂制药有限公司
XI'AN HENG SHENG TANG PHARMACEUTICAL CO., LTD.

索取详细资料 请联系我们

地址: 西安市纬什街新科路1号新城科技产业园新园产业大厦
电话: 029-82243200 82243359
传真: 029-82216138 邮编: 710043
网址: <http://www.hengshengtang.com>
E-mail: market@hengshengtang.com



BECKMAN-COULTER公司流式细胞仪

流程先锋 以准为本

Cytomics™ FC 500系列流式细胞术系统



- * 为研究性实验室设计了精密的、高效的操作程序
- * 采用单激光或双激光激发方式, 可进行5色分析
- * 配备共线性 (collinear) 的第二激光, 以便对抗体和荧光色素的选择具有更大的灵活性
- * 排除延时计算的需要和伴随的空间-分离光束的干扰

COULTER EPICS Altra™ 细胞分选仪

Altra系统是唯一的一种提供下列综合设备的细胞分选仪:

- * 高分辨率SortSense分析和分选仪
- * Windows数据获取和分析软件
- * HyperSort系统
- * 低压空冷或高压水冷激光系统
- * 细胞分选和监控摄像系统



COULTER EPICS XL™/XL-MCL™ 流式细胞仪



- * 单激光激发四色荧光
- * 光纤通讯及数字化信号传递
- * 可互换式光学滤片, 方便新染料的应用
- * 利用软件进行全矩阵颜色补偿
- * 通用的计算机工作站系统
- * 全程质控

美国贝克曼库尔特有限公司

北京办事处: 北京市朝阳区建国门外大街甲24号东海中心2005A, 100004; Tel: 010-65156028; Fax: 010-65156026

上海办事处: 上海市淮海中路283号香港广场南座3203-3205, 200021; Tel: 021-63906162; Fax: 021-63906543

广州办事处: 广州市环市东路362号好世界广场1808室, 510060; Tel: 020-83849534; Fax: 020-83849561

福州办事处: 福州市五四路89号置地广场1805, 350001; Tel: 0591-87879311; Fax: 0591-87879303

目 录

应大力加强中西医结合治疗 MDS 的研究(代前言)	麻 柔(1)
中医血液学学科的病证名(讨论稿)	(2)

一、专题发言

再生障碍性贫血治疗策略	储榆林(4)
中西医结合治疗白血病的现状与展望	邓成珊(4)
六神丸诱导白血病细胞凋亡的实验研究	戴锡孟等(7)
骨髓增生异常综合征的中西医研究进展	孙伟正(13)
砷剂治疗 MDS 概况	麻 柔(28)

二、大会发言

(一)骨髓异常增生综合征(MDS)

中医药治疗骨髓增生异常综合征的思路与方法	唐由君等(39)
骨髓增生异常综合征 158 例临床分析	杨淑莲等(41)
骨髓增生异常综合征的中医病机特点和治疗对策	周永明(42)
浅谈中医中药治疗 MDS 的临床体会	万丽娟(45)
骨髓增生异常综合征并发自身免疫性疾病相关研究——附 2 例报告	田 杨等(47)
青黄散治疗骨髓异常综合征的临床疗效观察	徐 述等(49)

(二)再生障碍性贫血

造血灵治疗慢性再生障碍性贫血临床观察	钱煦岱等(51)
抗胸腺细胞球蛋白及中药治疗急性再障 30 例疗效观察	刘 锋等(54)
慢性再生障碍性贫血中医辨证分型与 MHC—DR81* 等位基因相关性的研究	孙岸韬等(55)
中药并雄激素治疗急性再障 88 例临床研究河北省廊坊市中医院	杨淑莲等(58)
补肾活血法治疗慢性再生障碍性贫血的疗效机理探讨	王祥麒(60)
中药为主治疗急性再生障碍性贫血临床与实验研究(附 100 例疗效分析)	王继亮等(66)
补肾益气活血汤治疗再生障碍性贫血 30 例疗效分析	梁金秋(69)
鸡血藤复方治疗 31 例再生障碍性贫血儿童临床和实验观察	苏尔云等(70)
再生障碍性贫血发病机理研究进展	王继亮等(72)
中西医结合治疗再生障碍性贫血进展	鄢 毅(76)
再生障碍性贫血的免疫学发病机制及治疗的中医药研究进展	唐旭东(76)
益气养血补肾法合康力龙治疗重型再生障碍性贫血的临床研究	苏 伟等(79)
从临床诊治再生障碍性贫血谈中西医结合的思路	郑秋惠(91)
再生障碍性贫血的中医治法及药物分析	刘 锋等(93)
再生障碍性贫血中医治疗临证思路	陈信义(95)

中西医结合治疗重型再生障碍性贫血 30 例临床分析(摘要)	王忠芬等(97)
-------------------------------------	----------

(三) 白血病

中医药为主治疗慢性淋巴细胞白血病的体会	唐由君等(97)
中西医结合治疗急性白血病 80 例	杨文华等(100)
清肝化瘀汤治疗慢性粒细胞性白血病临床疗效观察	应平平(102)
清肝化瘀法为主治疗慢性粒细胞白血病疗效分析	王运律等(104)
白血病病因及论治探微	沈峰松等(105)
小剂量 HA 方案联合 ATRA、复方青黛片治疗急性早幼粒细胞白血病的临床研究	杨俊超等(107)
老年急性非淋巴细胞白血病疗效观察	王锦丽(109)
中西医结合治疗慢性粒细胞白血病 14 例	颜维仁等(110)
老年人急性白血病的临床特点	邓晓莉(112)
急性白血病 36 例长期无病生存临床研究	陈满才等(113)
急性白血病患者生命质量调查与中药干预	刘清池等(114)
中西医结合治疗慢性粒细胞白血病急变期 26 例生存期观察	张 霞等(116)
益气养阴清热法配合化疗治疗急性白血病临床疗效观察	徐瑞荣等(118)
中西医结合治疗急淋 10 例、急非淋 20 例的临床观察	马小美等(120)
格列卫治疗慢性粒细胞白血病合并骨髓纤维化完全缓解一例	张晓东等(121)
特有的免疫表型特征确定 t(8;21)急性髓性白血病的诊断及预后	胡晓梅等(121)
急性淋巴细胞白血病伴 CD13 阳性表达研究	杨晓红等(122)
单味中药成分逆转白血病多药耐药基础研究评述	李冬云等(123)
黄世林教授立法“驱邪复正”主治急性早幼粒细胞白血病的临床研究	孙淑君等(127)
解毒维康片治疗急性白血病 5 例报告	黄一虹等(131)

(四) 出血性疾病

血液粘滞综合症假说与血栓病、出血性疾病关系探讨	李国贤(137)
病毒所致弥散性血管内凝血的特点及治疗	张晓东(137)
凉血解毒法治疗慢性血小板减少性紫癜临床对照研究	武大勇等(138)
阿赛松联合消紫癜汤治疗慢性特发性血小板减少性紫癜 30 例疗效观察	彭惠芬(141)
中药治疗过敏性紫癜 67 例观察(摘要)	胡乃平等(143)
免疫性血小板减少性紫癜病证结合模型的建立与评价	陈信义等(144)
CSA 及中药治疗难治性免疫性血小板减少性紫癜(摘要)	李 柳(153)
解毒祛瘀法治疗慢性原发性血小板减少性紫癜的临床研究	李 铁等(153)

(五) 溶血性疾病

中药治疗先天性溶血性疾病 30 例观察	李海燕等(154)
阵发性睡眠性血红蛋白尿并发感染的临床分析	刘清池等(156)
自身免疫性溶血性贫血 29 例临床研究	胡乃平等(158)

(六) 实验研究

补髓生血颗粒对慢性再障患者骨髓基质细胞相关粘附分子作用机制的实验研究	孙伟正等(158)
补髓生血颗粒对慢性再障患者骨髓单个核细胞 VLA-4/CD _{49d} 及 c-kit/CD ₁₁₇ 表达的影响	罗梅宏等(161)

补髓生血颗粒对肾阳虚、肾阴虚型慢性再障患者骨髓细胞凋亡指数及 Bax 基因表达水平的影响	孙巍巍等(165)
补髓生血颗粒对慢性再生障碍性贫血患者骨髓造血细胞粘附作用机理影响的实验研究	孙伟正等(167)
三七皂苷促进造血干/祖细胞增殖分化及诱导 MAPK 信号传递途径	高瑞兰等(174)
三七皂苷促进造血祖细胞增殖及诱导糖皮质激素受体核转录因子的研究	高瑞兰等(177)
人参皂苷诱导 T 淋巴白血病 Jurkat 细胞凋亡的研究	陈小红等(180)
人参二醇(PDS)诱导巨核系 CHRF-288 和 Meg-01 细胞的分化及基因表达谱	吴超群等(180)
七叶皂苷诱导 HL-60 细胞凋亡的研究	成志等(186)
川芎嗪对 BMT 小鼠骨髓基质细胞 Endostatin 表达的影响	刘文励等(189)
川芎嗪对同基因骨髓移植小鼠骨髓中 VCAM-1/VLA-4 表达的影响	孙汉英等(193)
雷公藤内酯醇对急性淋巴细胞白血病 Molt4 细胞系 p15 基因表达的影响	沈建箴等(196)
砷剂对人骨髓瘤 U266 细胞系 p16 基因去甲基化诱导表达及其机制的研究	沈建箴等(199)
雷公藤多甙对特发性血小板减少性紫癜小鼠 T 细胞亚群影响的实验研究	严鲁萍等(202)
交泰丸对实验性糖尿病大鼠血糖及血液流变学指标的影响(摘要)	黄河清等(208)
骨髓细胞 G 显带染色体核型分析中多数量高质量中期分裂相的获得(摘要)	胡晓梅等(208)
芪龙调血方治疗免疫性血小板减少性紫癜实验研究	富琦等(208)
薯蓣皂甙体外抑制白血病细胞增殖研究	高智捷等(220)
金薯叶止血合剂治疗 ITP 药效学研究(摘要)	许勇钢等(223)
应用四色流式细胞术同时检测 Th、Tc 细胞亚群(摘要)	许勇钢等(223)

三、大会交流

中医药治疗原发性骨髓纤维化的思路与方法	唐由君等(224)
中草药抗感染的研究进展	吴玉红等(226)
胃复安穴位注射在化疗止吐中的研究(摘要)	阎轶鹏等(232)
复元愈肝胶囊治疗慢性肝炎性脂肪肝 66 例疗效观察(摘要)	黄骏等(232)
甲抗性贫血的发病机理与诊断治疗	林淑芬等(233)
骁悉治疗硬皮病一例	高夏芬等(236)
单纯中药治疗骨髓纤维化一例	宋淑花等(236)
活血化痰疗法在血液病中的应用	米丰年(236)
理气活血中药在治疗良性造血异常疾病中的作用(摘要)	谢晓平(238)
髓劳及辨治探要(摘要)	张翠松(239)
血液病中医辨病施治初探	孙颖立(239)
血细胞分离机在血液病治疗中的应用(摘要)	许勇钢等(241)
组织细胞坏死性淋巴结炎一例临床分析及文献复习	王欣等(241)
闭经致真性红细胞增多症的辨证论治	侯淑英等(243)
清血颗粒治疗肾移植术后红细胞增多症血瘀证的机理研究	杨宇飞等(245)

应大力加强中西医结合治疗 MDS 的研究（代前言）

麻 柔

骨髓增生异常综合征（myelodysplastic syndrome, MDS）是一组骨髓造血干细胞的克隆性疾病。发病以中老年多见。以外周血一系、两系或三系减少，骨髓病态造血及可能发展成为急性白血病为主要特征，是一种临床难治性血液系统疾病，近年的研究表明免疫异常导致的干细胞损伤与 MDS 患者的外周血三系减少，白血病转化的发生、发展、转归等生物行为有密切关系；MDS 常有细胞遗传学异常，且染色体异常与 MDS 的疗效及预后关系密切。随着社会老龄化，近年来发病似有上升的趋势。

目前，骨髓增生异常综合征尚无特效的治疗方法。一般主张，原始细胞不增高者治疗以雄激素为基础，原始细胞增高者采用小剂量阿糖胞苷诱导治疗或联合化疗。但治疗效果不理想。

中西医结合治疗 MDS 的研究虽起步较晚，但已取得了较明显的效果，显示出较大的潜力，砷剂治疗在国内外均有报道，但国内临床研究多限于小样本的临床报道，缺乏多中心、前瞻性、对照研究。

有条件的单位应大力加强中西医结合治疗 MDS 的多中心、前瞻性、对照研究。

中医血液学学科的病证名 (讨论稿)

一、中、西医病、证名来自两个不同医学系统,不可强合而为一,但为临床应用方便,可由对应者或可大致对应者,拟出;无对应者,暂不拟。

西医病名

贫血

缺铁性贫血

钩虫病

小儿缺铁性贫血

急慢性失血性贫血、急性失血性贫血

巨幼细胞贫血

再生障碍性贫血

急性再生障碍性贫血

慢性再生障碍性贫血

溶血性贫血

自身免疫性溶血性贫血

阵发性睡眠性血红蛋白尿

小儿先天性溶血性黄疸

各种继发性贫血

白血病

急性白血病

慢性白血病

多发性骨髓瘤

淋巴瘤

骨髓增生性疾病

真性红细胞增多症

原发(继发性)血小板增多症

骨髓纤维化

出凝血疾病

原发(继发性)血小板减少症

原发(继发性)血小板减少症(急性)

原发(继发性)血小板减少症(慢性)

过敏性紫癜

白(粒)细胞减少(或缺乏)症

骨髓增生异常综合症(MDS)

中医病证名

血虚、血劳

萎黄病、黄肿病

黄胖病

痞气

血脱、血枯

冷劳

髓劳

髓枯

髓劳

血疸、虚黄

虚黄

女劳疸?

胎疸

血虚

血癌

急劳、热劳

症瘕、积聚

骨蚀骨痹?

石疸、石瘦

血实

留血

血泣、“虾血”、“脉痹”

症瘕、积聚

血证(紫斑)

葡萄疫

紫癜病

紫癜病

虚劳?

虚劳?

二、国家中医药管理局 1997 年【中医病证治法术语】中有关血液病归于“传染病、寄生虫病”(1 条)、“心系病类”(6 条)、“肝系病类”(2 条)、“颈瘰病类”(1 条),计 10 条:

3.32 黄胖(肿)病

(钩虫病)钩虫寄生于小肠,湿热虫毒内蕴,脾虚失运,气血亏虚。以善食易饥,疲乏、皮肤

萎黄，浮肿，大便检查有钩虫卵为主要表现的寄生虫病。

5.14 血劳

因先后天亏损，血液生化不足，或因失血、溶血等耗伤血液，以致营血亏少，脏器失其濡养。以面白舌淡，眩晕心悸，血红细胞少、血红蛋白量低为主要表现的劳病类疾病。

5.15 髓劳

因先后天不足，精血生化无源，或因有毒药物及理化因素伤正，邪毒瘀阻，新血不生。以出血、血亏、全血细胞减少，易染邪毒为主要表现的劳病类疾病。

5.16 紫癜病

因先天禀赋不足，或邪毒壅遏脉络，或因病久脾虚不摄等，使血溢脉外。以皮肤、粘膜出现紫暗色斑块及其他部位出血为主要表现的出血类疾病。

5.17 血溢病

因禀赋不足，或后天损伤，气虚不能摄血，或阴虚火旺，迫血妄行所致。以容易出现持久难止的出血为主要表现的出血类疾病。

5.18 恶核

因气机郁结，或精气亏虚，温毒内伏，瘀痰凝滞所致。以肢体出现无痛性瘰癧肿块，胁下肿块，或有发热等为主要表现的癌病类疾病。

5.19 血脱

因突然大量失血，以致血脉空虚，全身失却血液濡养，气血欲脱。以出血，面色苍白，脉微或芤，血压显著降低为主要表现的脱病类疾病。

8.11 血疸

因输血、某些药物、蛇毒、疟疾等使血液损坏而产生溶血所致。以黄疸，面白，头晕等为主要表现的疸病类疾病。

8.12 蚕豆黄

因食入新鲜蚕豆引起急性溶血所致。以黄疸，身痛，面白，心悸等为主要表现的疸病类疾病。

11.4 石瘰

多因情志内伤，肝脾气滞，瘀痰互结、化火伤阴而成，以颈前肿块坚硬如石，推之不移，凹凸不平为主要表现，发生于颈瘰部的癌病类疾病。

一、专题发言

再生障碍性贫血治疗策略

储榆林

中国医学科学院血液学研究所 300020

中西医结合治疗白血病的现状与展望

邓成珊

中国中医研究院西苑医院 100091

一、命名

1. 热劳
2. 急劳
3. 血癌

二、病因病机

1. 热毒入髓
2. 正气虚损
3. 伏气温病

三、临床特点

1. 起病急、进展快、儿童及青壮年居多
2. 贫血、出血、感染、骨痛、肝脾淋巴结肿大
3. 证候：本虚标实、虚实相兼、具有温热病及虚劳病的特点
4. 病程长短不一，病情预后各异，与多种因素相关，总的预后改善

四、治疗原则

三个结合：

1. 扶正与祛邪
2. 辨证与辨病
3. 并用化疗当有机结合

五、辨证论治：辨证分型

1. 邪毒隐伏证：以乏力、低热、肝脾轻度肿大为主，可选牛黄解毒片、六神丸、神犀丹。
2. 瘟毒入髓证：以壮热、贫血、骨痛为主，若发热明显，选五味消毒饮、清瘟败毒饮；若出血明显，选清营汤、犀角地黄汤。
3. 血瘀痰结证：以症瘕痞块、瘰癧、痰核为主，选清气化痰丸、消瘰丸、鳖甲煎丸、小金丹、桃红四物汤。
4. 气阴两虚证：以乏力、虚汗、口干为主，可兼见气血两虚或阴阳两虚证候。多见于化疗后或缓解期，可酌情选生脉饮、参芪地黄汤、补中益气汤。

六、辨证论治：代表方剂

1. 贵阳方：犀角地黄汤加減
2. 兰州方：麦味地黄汤加減
3. 哈医大二院方：三才封髓丹加味
4. 江西方：杀癌七号方（可治恶组）

七、分期论治

1. 初期：多以邪实为主，治宜清热泻火解毒，加入有抗癌作用的中成药
2. 中期：多为虚实相间，治宜扶正驱邪，调理脏腑
3. 后期：多以本虚为主，治宜扶正培本，以益气养阴为主

八、结合化疗期论治

化疗期：根据化疗引起的副反应，采取急则治标法，有胃肠反应者，以照顾脾胃为主，治宜芳香化湿、和胃降逆；有骨髓抑制者，用补血养肾法

化疗间歇期：多用益气养阴法或清髓解毒法

九、单验方：复方成药

1. 六神丸（天津）
2. 紫金锭（广州）
3. 小金丹（成都）
4. 白丹（西苑医院）
5. 402片（苏医）
6. 癌灵I号注射液（哈医大）

十、单验方：单味药

1. 蟾酥（湖医）
2. 干蟾粉（佳木斯）
3. 肿节风（浙江）
4. 漆姑草（湘西土家族）
5. 墓头回（苏医、西苑医院）
6. 白花蛇舌草（江苏吴县）

十一、单验方：生物碱

1. 三尖杉酯碱
2. 野百合碱
3. 喜树碱
4. 娃儿藤生物碱（广西）
5. 西豆根甲碱（江西）

十二、实验研究

1. 细胞毒型药物：冬凌草、贯众素、大黄、茯苓、人参、大豆皂甙、三七皂甙、雷公藤、小红参、苏木、美登木属、茜草、墓头回等
2. 提高机体免疫力型药物：云芝、香菇、虫草多糖、补骨脂素、刺五加皂甙、黄芪、十全大补汤等
3. 诱导分化类药物：三尖杉酯碱、人参皂甙、苦参、熊胆、巴豆、三七皂甙等

十三、疗效

1. 完全缓解率为 20% - 55%，总缓解率 46% - 90%。随着化疗新药的发现及中医治疗的改进，疗效在逐渐提高。
2. 有报道急非淋温热型缓解率最低，急淋肝肾阴虚型缓解率低。中西医结合治疗较单用化疗总缓解率要高，远期疗效也较高。

十四、研究进展

1. 砷剂治疗急性早幼粒细胞白血病（突破进展）
 - (1) 癌灵 I 号注射液：亚砷酸及轻粉，初治 CR73.3%，复发难治 CR52.3%
 - (2) 青黄散：西苑医院 1985 年最先报道，存活 21 年
 - (3) 复方黄黛片：大连部队医院（黄世林）CR90%以上（青黛、雄黄、丹参、太子参等）
 - (4) 雄黄及复方柏子仁丸：北大人民医院，对雄黄成分、有效剂量、代谢、副作用等有深入研究，疗效不亚于亚砷酸。
机理：原浆毒，诱导细胞凋亡，t (15, 17) 阳性
2. 抗多药耐药中药：
 - (1) 浙贝母（东直门医院）已进入临床使用阶段
 - (2) 汉防己甲素
 - (3) 川芎嗪
3. 微小残留病（MRL）：残留白血病细胞小于 10^6 ，免疫功能低下，中医属“正虚邪恋”，益气养阴方疗效较高（西苑医院）
4. 抗急性白血病复发（山东中医药大学附院）
 - (1) 清热解毒法贯穿于治疗全过程；益气养阴能延迟或避免白血病复发；补肾健脾是抗白血病复发的重要措施。
 - (2) 中成药六神丸、六味地黄丸均有抗复发作用

十五、思考与展望

中西医结合治疗急性白血病已取得重大突破，有哪些经验值得总结和发扬，下一步的路如何

走, 提出几点意见, 供同道参考。

1. 中西医结合治疗的合理性:

1) 坚持三个结合(中西医结合、病证结合、宏观与微观辨证结合), 优势互补, 科学严谨, 减少费用支出, 力求提高疗效。

2) 辨证看待单味药与复方问题。

3) 不断优化中西医结合治疗方案。

2. 中西医结合治疗的切入点:

1) 起步点要高, 少做重复工作。要先易后难, 逐步深入。

2) 在已取得成果或苗头的方面深入研究, 扩大研究, 如砷制剂、生物碱等。

3) 瞄准学科前沿的热点课题攻关, 如抗白血病复发。

3. 突破与创新

1) 依托古籍、文献、实验、民间、临床资料等, 提高敏锐感及洞察力, 注意偶然发现。

2) 大胆严谨, 持之以恒, 深入钻研, 在治疗的难点及空白点上下功夫。中医要在学科前沿上有所作为(如干细胞移植合并症, 减少大剂量化疗相关死亡等)。

3) 解放思想, 敢于突破, 中医中药力争成为治疗急性白血病的方面军及主力军(如砷制剂治疗 M3 等)。

六神丸诱导白血病细胞凋亡的实验研究

戴锡孟 孟静岩 郭义 于志峰 马洁 徐芳 黄振东

天津中医学院 300193

我们在临床应用六神丸治疗白血病取得良好疗效的基础上, 为了进一步明确六神丸治疗白血病的作用机理, 进行了白血病细胞株 HL-60、NB4 的体外培养, 采用细胞形态学、原位末端标记、DNA 电泳及流式细胞仪等多种方法, 全面综合地检测了六神丸诱导白血病细胞凋亡的作用, 同时采用分子生物学方法观察了六神丸对相关凋亡基因表达的影响, 现报道如下。

1 六神丸诱导 HL-60、NB4 细胞凋亡的形态学观察

1.1 分组及加药方法

1.1.1 取对数生长期细胞, 用 RPMI-1640 液将细胞轻轻吹打为单细胞悬液, 调细胞浓度为 $2 \times 10^4/\text{ml}$, 接种于 96 孔培养板, 每孔 $180\mu\text{l}$ 。

1.1.2 六神丸提取液使用前以 RPMI-1640 液倍比稀释, 每孔加入六神丸液 $20\mu\text{l}$, 使药物终浓度分别为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$, 空白对照组加入 RPMI-1640 液 $20\mu\text{l}$ 。每组设复孔 8 个。

1.2 吉姆萨染色和荧光染色 按照相关参考文献进行。

1.3 结果

1.3.1 吉姆萨染色

1.3.1.1 NB4 细胞形态: 空白组细胞体积较大, 胞核大, 核仁不明显, 核染色质较疏松, 胞浆中可见散在颗粒, 细胞空泡较多。经 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 六神丸作用 32h 后, 细胞变小,

核染色质固缩,在胞核边缘形成月牙形。进而核膜将核染色质包裹形成凋亡小体。

1.3.1.2 HL-60 细胞形态:空白组细胞体积较大,胞核大,可见多个大核仁,核染色质较疏松,胞浆中颗粒不明显,细胞空泡较多。经六神丸作用 32h 后,细胞变小,核染色质固缩在胞核边缘。进而核膜将核染色质包裹形成凋亡小体。

1.3.2 荧光染色:空白组细胞体积较大,圆形,核浆比大。细胞核完整,染色质均匀,呈绿色。六神丸组,大部分细胞呈现典型的细胞凋亡形态,核碎裂成小块,染色质聚集,呈亮绿色,此为早期凋亡细胞,其中红色为晚期凋亡细胞,核碎裂成小块。其中淡红色,细胞轮廓不清的为坏死细胞。

2 DNA 电泳

2.1 分组及给药方法:取同代细胞,用 15% FCS RPMI-1640 培养液,以密度 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 转种于 96 孔板中。24h 后,用 0.5% FCS RPMI-1640 培养液 $180\mu\text{l}$ /孔培养 24h,使细胞同步于 G0 期。然后分 (1) 空白组,加无血清 RPMI-1640 培养液 $20\mu\text{l}$ 。(2) 高浓度六神丸组,加入六神丸提取液 $20\mu\text{l}$,令终浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。(3) 低浓度六神丸组,加入六神丸提取液 $20\mu\text{l}$,令终浓度为 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 。每组设 6 个复孔。

2.2 提取 DNA:按照试剂盒说明操作。

2.3 DNA 电泳:紫外线灯下观察、摄片。

2.4 结果

2.4.1 NB4 细胞电泳结果: $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 六神丸作用 32h 后 NB4 细胞出现明显的梯状带。 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 六神丸作用 32h 后 NB4 细胞 DNA 电泳为连续条带,说明细胞坏死, DNA 降解。对照组未出现梯状带。

2.4.2 HL-60 细胞电泳结果: $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 六神丸作用 32h 后 HL-60 细胞 DNA 电泳呈现明显的梯状带。 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 六神丸作用 32h 后 HL-60 细胞 DNA 电泳为连续条带,说明细胞坏死, DNA 降解。对照组未出现梯状带。

3 原位缺口标记法 (TUNEL)

3.1 分组及给药方法:六神丸组共设 5 个梯度,每孔加入六神丸液 $20\mu\text{l}$,使药物终浓度分别为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 。空白对照组加入 RPMI-1640 液 $20\mu\text{l}$ 。另设三氧化二砷 (As_2O_3) 对照组,加入 $1\mu\text{mol}/\text{ml}$ As_2O_3 $20\mu\text{l}$ 。

3.2 原位末端标记按照试剂盒说明操作。

3.3 光镜下计数,计算凋亡率。

凋亡率 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$

3.4 结果

3.4.1 凋亡形态观察:凋亡细胞着色深,呈深褐色;正常细胞呈浅棕色,二者细胞均完整。

3.4.2 原位凋亡结果

3.4.2.1 六神丸提取液对 NB4 细胞的诱导凋亡作用:六神丸提取液各浓度组不同作用时间段, NB4 细胞凋亡率均较空白组显著提高, $P < 0.01$ 。且各浓度组随作用时间的延长,凋亡率显著提高。相同时间段不同浓度六神丸诱导 NB4 细胞的凋亡率各不相同。结果表明,六神丸浓度越高,细胞凋亡率越高,呈现出明显的量效关系。

表1 不同浓度六神丸诱导 NB4 细胞凋亡率 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	凋亡率 (%)			
	8h	12h	24h	32h
空白组	1.8 ± 0.2	2.1 ± 0.4	2.4 ± 0.3	2.8 ± 0.1
2.5μg/ml	15.8 ± 4.7 ^{▲*}	18.1 ± 1.3 [▲]	20.6 ± 3.5 [▲]	32.6 ± 2.7 [▲]
5μg/ml	16.2 ± 0.2 ^{▲*}	23.7 ± 1.3 [▲]	36.5 ± 4.0 [▲]	40.5 ± 2.7 [▲]
10μg/ml	21.9 ± 2.1 ^{▲*}	26.3 ± 3.2 [▲]	37.4 ± 2.30 [▲]	45.9 ± 3.1 [▲]
50μg/ml	23.7 ± 3.1 ^{▲*}	33.7 ± 1.3 ^{▲*}	42.5 ± 6.3 [▲]	47.3 ± 0.4 [▲]
100μg/ml	31.7 ± 0.8 ^{▲*}	36.5 ± 2.7 ^{▲*}	56.8 ± 1.4 ^{▲*}	64.3 ± 4.3 ^{▲*}
As ₂ O ₃	10.9 ± 2.1 [▲]	22.8 ± 3.2 [▲]	41.8 ± 0.3 [▲]	56.8 ± 1.0 [▲]

▲与相同时间空白组比较 $P < 0.01$, *与相同时间 As₂O₃ 组比较 $P < 0.01$

3.4.2.2 六神丸对 HL-60 细胞的诱导凋亡作用: 六神丸提取液各浓度组不同作用时间段, HL-60 细胞凋亡率均较空白组显著提高, $P < 0.01$ 。且各浓度组随作用时间的延长, 凋亡率显著提高。相同时间段不同浓度六神丸诱导 HL-60 细胞的凋亡率各不相同。结果表明, 六神丸浓度越高, 细胞凋亡率越高, 呈现出明显的量效关系。

表2 不同浓度六神丸诱 HL-60 细胞凋亡率 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	凋亡率 (%)			
	8h	12h	24h	32h
空白组	1.2 ± 0.3	2.0 ± 0.6	2.3 ± 0.5	3.1 ± 0.5
2.5μg/ml	11.3 ± 2.0 [▲]	15.2 ± 4.3 [▲]	23.5 ± 4.1 [▲]	37.5 ± 6.1 [▲]
5μg/ml	13.5 ± 3.2 [▲]	19.6 ± 1.5 [▲]	32.2 ± 2.6 [▲]	45.1 ± 3.5 [▲]
10μg/ml	23.5 ± 3.1 [▲]	26.5 ± 1.2 [▲]	39.5 ± 0.5 [▲]	52.3 ± 6.1 [▲]
50μg/ml	25.6 ± 2.4 [▲]	32.1 ± 0.6 [▲]	45.2 ± 3.1 [▲]	55.6 ± 2.4 [▲]
100μg/ml	28.6 ± 3.5 ^{▲*}	35.6 ± 2.6 ^{▲*}	56.4 ± 3.6 ^{▲*}	68.6 ± 5.2 ^{▲*}
As ₂ O ₃	21.1 ± 1.3 [▲]	28.4 ± 1.5 [▲]	46.8 ± 4.3 [▲]	58.3 ± 5.1 [▲]

▲与相同时间空白组比较 $P < 0.01$, *与相同时间 As₂O₃ 组比较 $P < 0.01$

4 流式细胞仪检测细胞凋亡

4.1 Annexin V/PI 染色法: 取 490μl 细胞悬液加入 5μl FITC-Annexin V, 5μl PI (浓度 250μg/ml), 混匀, 置冰浴, 暗处孵育 10min, PBS 洗两遍, 上机检测。

4.2 结果

4.2.1 Annexin V/PI 双染流式细胞仪测定细胞凋亡率

4.2.1.1 六神丸对 NB4 细胞的诱导凋亡作用: 50μg/ml 的六神丸作用于 NB4 细胞 8, 12, 18, 24 和 32h 后检测, C 区细胞所占比例逐渐增多, 以 32h 为最多。表明随时间延长, PI-Annexin V+ 细胞增多, 即凋亡细胞增多, 其凋亡率分别是 0.74%、8.16%、12.8%、17.7%、37.7%。虽然细胞自身也可有凋亡, 但比例很少, 32h 后细胞自身的凋亡率仅为 3.37%, 可忽略不计。

表 3 50 μ g/ml 六神丸对 NB4 细胞凋亡的影响 (%)

作用时间 (h)	凋亡率 (%)	
	空白组	六神丸组
8	0.45	0.74
12	1.05	8.16
18	1.26	12.8
24	2.58	17.7
32	3.37	37.7

4.2.1.2 六神丸对 HL-60 细胞的诱导凋亡作用: 50 μ g/ml 的六神丸作用于 HL-60 细胞 8, 12, 18, 24, 32h 后检测, C 区细胞所占比例逐渐增多, 即 PI- /Annexin V+ 细胞增多, 显示凋亡细胞增多, 其中尤以 32h 为最多。由表 4 可见, 随着六神丸作用时间的延长, 凋亡率也逐渐升高, 从 0.82% 升至 23.2%。

表 4 50 μ g/ml 六神丸对 HL-60 细胞凋亡的影响

作用时间 (h)	凋亡率 (%)	
	空白组	六神丸组
8	0.37	0.82
12	1.56	7.17
18	1.83	7.78
24	2.46	12.7
32	3.55	23.2

4.2.1.3 NB4、HL-60 细胞凋亡率的比较: 表 5 可见, 在 2.5-50 μ g/ml 之间细胞凋亡率与药物浓度成正比, 两种细胞均在 50 μ g/ml 浓度作用下凋亡率最高, 分别为 37.7% 和 23.2%。浓度升高到 100 μ g/ml, 细胞凋亡率反而降低, 分别为 15.0%、9.35%。不同浓度作用下 NB4 细胞的凋亡率均不同程度高于 HL-60 细胞。

表 5 六神丸对 NB4 和 HL-60 细胞凋亡率的影响 (32h)

药物浓度 (μ g/ml)	凋亡率 (%)	
	NB4	HL-60
0	1.11	0.89
2.5	1.69	1.05
5	8.81	1.71
10	10.5	5.58
50	37.7	23.2
100	15.0	9.35

4.2.2 细胞凋亡与细胞周期的关系: 流式细胞仪 DNA 周期分析显示随着作用时间延长, S + G₂ 期细胞逐渐减少, G₁ 期细胞相对增多, 提示六神丸可阻止 NB4 细胞从 G₁ 期进入 S 期, 并主要诱

导 G₂/M 期细胞凋亡。

表 6 六神丸对 NB4 细胞周期的影响

作用时间 (h)	细胞比例 (%)	
	G ₁ 期	S + G ₂ 期
0	48.9	51.1
12	55.7	44.3
24	55.7	42.5
32	65.3	34.7

5 六神丸对白血病细胞凋亡相关基因的影响

5.1 提取总 RNA: 按试剂盒步骤进行操作。

5.2 RT-PCR 反应: 引物的设计与合成由上海生工生物公司合成。逆转录及扩增按试剂盒步骤进行操作。

5.3 结果

5.3.1 总 RNA 提取结果: 所提总 RNA, 经核酸蛋白分析仪测定, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8—2.0 之间, 说明所提总纯度较高, 且较完整, 没有降解, 适于进一步分析。

5.3.2 RT-PCR 结果

5.3.2.1 NB4 细胞: 结果显示各组的 β -actin mRNA 的 PCR 产物电泳条带, 在明暗或宽窄方面均匀一致, 而各组的 bcl-2、c-myc、P53 的 PCR 产物电泳条带则显示不均一。空白组 bcl-2 电泳条带最亮, 六神丸组电泳条带亮度较小。六神丸组 c-myc、p53 电泳条带均较空白组亮度增强。提示六神丸能降低 NB4 细胞 bcl-2 基因 mRNA 的表达, 上调 c-myc、p53 基因 mRNA 的表达。

5.3.2.2 HL-60 细胞: 结果显示各组的 β -actin mRNA 的 PCR 产物电泳条带, 在明暗或宽窄方面均匀一致, 而各组的 bcl-2、c-myc 的 PCR 产物电泳条带则显示不均一。空白组 bcl-2 电泳条带最亮, 六神丸组电泳条带亮度较小。六神丸组 c-myc 电泳条带均较空白组亮度增强。提示六神丸能降低 HL-60 细胞 bcl-2 基因 mRNA 的表达, 上调 c-myc 基因 mRNA 的表达。

6 讨论

6.1 祖国医学对白血病的认识及六神丸的立法依据

祖国医学对白血病这一病名没有明确的记载, 但依据其贫血、发热、出血、肝脾淋巴结肿大等临床表现, 与中医“血证”、“痰核”、“温病”、“急癆”等相近。我们认为白血病属于邪实为主, 而正虚系邪实所致。其邪实乃指白血病细胞的恶性增生, 由此而抑制了骨髓的正常造血功能, 导致贫血, 血虚机体失于濡养, 故出现虚损之象。故治疗中应以祛邪为主。六神丸源于雷氏方, 由牛黄、麝香、蟾酥、雄黄、珍珠、冰片组成。其主要功能为清热解毒、消肿止痛, 临床乃解毒疗咽之要药。六神丸的功效正契合了该病的病因病机。我们从七十年代开始应用大剂量六神丸治疗急、慢性白血病取得了良好的疗效。我们在临床应用六神丸治疗白血病的过程中体会到: (1) 六神丸诱导缓解所需剂量较大 (成人每天 90~120 粒, 小儿酌减), 而维持缓解所需剂量相对较小 (成人每天 30~60 粒), 每疗程以两到三周为宜, 间歇一周左右可再用。时间过短不足以维持患者持续缓解。(2) 无严重的骨髓抑制和毒副作用。(3) 六神丸可有效地对抗白血病患者因免疫功能降低所导致的