

# 基于骨髓基质细胞自噬和旁分泌探讨黑地黄丸治疗肾性贫血的作用机制

赵平<sup>1</sup>, 刘伟伟<sup>1</sup>, 张亮<sup>1</sup>, 张法荣<sup>2\*</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

**[摘要]** 目的:观察黑地黄丸含药血清(medicated serum of Hei Dihuangwan, MSHDW)对肾性贫血大鼠骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)自噬和旁分泌作用的影响,探讨黑地黄丸(Hei Dihuangwan, HDW)治疗肾性贫血的可能作用机制。**方法:**建立肾性贫血大鼠模型,梯度密度离心和贴壁培养法分离正常和肾性贫血大鼠 BMSCs,取第3代细胞饥饿诱导1 h后予不同处理分为5组,分别为正常组,模型组,HDW高、中、低剂量组。MTT法检测细胞存活率,电子显微镜观察自噬小体,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法测定自噬相关基因 LC3 I, LC3 II, Beclin-1 mRNA 表达,ELISA法检测培养液上清干细胞因子(SCF),促红细胞生成素(EPO),胰岛素样生长因子(IGF-1)水平,典型相关分析研究自噬基因与造血因子之间的相关性。**结果:**与正常组比较,模型组 BMSCs 存活率明显降低( $P < 0.01$ ),HDW高、中、低剂量组较模型组细胞存活率升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),剂量越高作用越强;电镜下观察,模型组自噬小体多于正常组,HDW高、中、低剂量组自噬小体均少于模型组;模型组自噬相关基因 mRNA 水平高于正常组( $P < 0.01$ ),HDW高、中剂量组自噬相关基因 mRNA 水平低于模型组( $P < 0.05, P < 0.01$ );模型组 BMSCs 培养上清造血因子水平低于正常组( $P < 0.01$ ),HDW高、中剂量组造血因子水平高于模型组( $P < 0.05, P < 0.01$ ),剂量越高作用越强;典型相关分析显示,在 MSHDW 作用下, BMSCs 自噬基因水平与抑制旁分泌作用呈高度正相关。**结论:**HDW 治疗肾性贫血的作用机制可能与下调 BMSCs 自噬水平和促进旁分泌造血因子有关。

**[关键词]** 黑地黄丸; 肾性贫血; 骨髓基质细胞; 自噬; 旁分泌

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0146-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020146

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161027.1507.040.html>

**[网络出版时间]** 2016-10-27 15:07

## Explore Mechanism of Hei Dihuangwan in Treating Renal Anemia Based on Autophagy and Paracrine Secretion

ZHAO Ping<sup>1</sup>, LIU Wei-wei<sup>1</sup>, ZHANG Liang<sup>1</sup>, ZHANG Fa-rong<sup>2\*</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250014, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of medicated serum of Hei Dihuangwan (MSHDW) on autophagy and paracrine secretion in bone marrow stromal cells (BMSCs) and explore the mechanism of Hei Dihuangwan (HDW) on renal anemia. **Method:** Rat models of renal anemia were established, and then normal and renal anemia BMSCs were separated by using gradient density centrifugation and adherent culture method. The third generation BMSCs were used and after starvation induction for 1 h, they were divided into normal group, model group, HDW high dose, middle dose and low dose groups. Cell survival rate was detected by MTT method; electron microscopy was used to observe the autophagosomes; the mRNA expression levels of LC3 I, LC3 II, and

**[收稿日期]** 20151118(001)

**[基金项目]** 山东省自然科学基金项目(ZR2014HL097)

**[第一作者]** 赵平, 硕士, 主治医师, 从事中医肾脏病的诊治工作, Tel:13583805637, E-mail:13583805637@163.com

**[通讯作者]** \*张法荣, 博士, 主任医师, 从事中医肾脏病的诊治工作, Tel:13793188027, E-mail:farongzhang@163.com

Becline-1 were determined by Real-time PCR. ELISA was used to detect stem cell factor (SCF), erythropoietin (EPO), and insulin-like growth factor (IGF) -1 in culture supernatant. Finally, the correlation between autophagy genes and hematopoietic factors were investigated by using canonical correlation analysis. **Result:** As compared with normal group, BMSCs survival rate was significantly decreased in model group ( $P < 0.01$ ); the cell survival rates in HDW high dose, middle dose and low dose groups were higher than that in model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the effect was enhanced with the increase of dose. Under the electron microscope, the number of autophagosomes in model group was larger than that in normal group; and the number in HDW various groups was all smaller than that in model group; mRNA expression level of autophagy related genes in model group was higher than that in the normal group ( $P < 0.01$ ); mRNA expression levels of autophagy related genes in HDW high dose and middle dose groups were lower than those in model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Hematopoietic factors in culture supernatant of model group BMSCs were less than those in normal group ( $P < 0.01$ ); the levels in HDW high dose and middle dose groups were higher than those in model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the effect was enhanced with the increase of dose. Canonical correlation analysis showed that, autophagy genes of BMSCs were highly positively correlated to inhibition of paracrine secretion under MSHDW effect. **Conclusion:** The mechanism of HDW in treating renal anemia may be related to down-regulating the levels of autophagy in BMSCs and promoting paracrine secretion hematopoietic factors.

[**Key words**] Hei Dihuangwan; renal anemia; bone marrow stromal cells; autophagy; paracrine secretion

肾性贫血是慢性肾脏病 (CKD) 的主要并发症之一,在 CKD 晚期是非常普遍的现象。其主要原因是促红细胞生成素 (EPO) 的相对缺乏。目前西医治疗以补充 EPO 为主,但由于 EPO 增加了高血压、癫痫的发生几率,甚至可能导致单纯红细胞再生障碍<sup>[1]</sup>,临床应用有一定风险。中医药治疗肾性贫血疗效确切,副作用较少,并且兼有刺激骨髓造血、保护肾功能等作用<sup>[2]</sup>,有重要研究价值。

古方“黑地黄丸”(Hei Dihuangwan, HDW) 出自《素问·病机气宜保命集》虚损论第二十二章,原方由苍术、熟地黄、干姜、大枣组成,明确指出有“养血益肾”作用。前期研究证实,HDW 治疗肾性贫血临床疗效显著,但其作用机制尚未阐明<sup>[3]</sup>。骨髓基质细胞 (BMSCs) 是造血微环境的重要组成部分,存在自噬现象<sup>[4]</sup>并可旁分泌干细胞因子 (SCF), EPO 和胰岛素样生长因子 (IGF-1) 等多种造血因子<sup>[5-7]</sup>。但 BMSCs 自噬是否影响旁分泌功能尚不清楚。为明确黑地黄丸是否经自噬途径影响旁分泌,课题组分别研究了黑地黄丸含药血清 (medicated serum of Hei Dihuangwan, MSHDW) 干预 BMSCs 自噬和旁分泌 SCF, EPO, IGF-1 的作用,并对二者进行典型相关分析以探讨 HDW 治疗肾性贫血的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 Wistar 大鼠 55 只,雄性,2 ~ 3 月龄,体重 (200 ± 20) g,由山东大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK (鲁) 2013-0009。

**1.2 药物及试剂** 苍术、熟地黄、干姜、大枣饮片购自山东中医药大学附属医院中药房,由山东中医药大学附属医院中心实验室姜月华研究员根据 2015 年版《中国药典》鉴定苍术为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* 的干燥根茎,产地江苏,批号 20150523。熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 干燥块根的炮制加工品,产地辽宁,批号 20150407。干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的干燥根茎,产地山东,批号 20150716。大枣为鼠李科植物枣 *Ziziphus jujube* 的干燥成熟果实,产地山东,批号 20150603。HDW 每 100 g 生药由苍术 32 g,熟地黄 32 g,干姜 2 g,大枣 34 g 组成,由山东中医药大学附属医院制剂室代为制作,温开水溶化后分别水浴浓缩成含生药 2, 1, 0.5 g · mL<sup>-1</sup> 的高、中、低质量浓度药液。均于 4 °C 冰箱保存,使用前用 40 °C 恒温水浴箱加温。药液制备由山东中医药大学附属医院制剂室完成。噻唑蓝 (MTT) 及二甲亚砜 (DMSO) (美国 Sigma 公司,批号分别为 M6886, D2650), Earle's 平衡盐溶液 (EBSS, 美国 Hyclone 公司,批号 NZD1130), Ficoll 淋巴细胞分离液 (美国 Solarbio 公司,批号 20150122); 大鼠 SCF, EPO, IGF-1 酶联免疫检测试剂盒 (上海博蕴生物科技有限公司,批号分别为 20150211, 20150105, 20150307)。

**1.3 仪器** IX71 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), Multiskan FC 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司), JEM-2100F 型透射电子显微镜 (日本电子株

式会社), Lightcycler480 型实时荧光定量 PCR (Real-time) PCR 仪(瑞士罗氏公司), MCO-20AIC 型二氧化碳培养箱(日本 Sanyo 公司), 3-18K 型低温高速离心机(德国 Sigma 公司)。

## 2 方法

**2.1 肾性贫血大鼠模型的建立**<sup>[8]</sup> 随机选取健康 Wistar 大鼠 20 只, 戊巴比妥钠  $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重腹腔注射麻醉, 俯卧位固定, 常规消毒皮肤, 暴露右肾, 剥离肾被膜, 结扎肾门, 切除右肾(保留肾上腺), 逐层缝合皮肤。第 1 次手术后 10 d, 同样方法麻醉后切除左肾上、下极肾实质, 以明胶海绵压迫止血, 关闭腹腔。术后 14 周检测大鼠血清肌酐, 尿素氮(BUN), 血常规, 随机选取同时达到大鼠 CRF 标准<sup>[9]</sup>(BUN > 19.9 mg%, 肌酐 > 0.59 mg%) 和贫血标准<sup>[9]</sup>(血红蛋白 <  $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的大鼠 10 只作为肾性贫血模型。

**2.2 含药血清制备** 将健康 Wistar 大鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 分别标记为 1 ~ 3 组, 分别按  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  (根据临床等效剂量换算而成) 予 HDW 高、中、低剂量药液 *ig*, 连续 10 d 后, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉( $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 腹主动脉取血。室温静置 2 ~ 4 h,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min, 分离血清, 分装,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冷冻备用, 标记为 1 号血清, 2 号血清, 3 号血清。临用时  $0.22 \text{ } \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌后 DMEM 低糖培养基配制成终浓度 10% 的含药血清培养基。

**2.3 大鼠 BMSCs 培养** 参照文献方法<sup>[10]</sup>, 健康 Wistar 大鼠 5 只、肾性贫血大鼠 10 只脱颈处死后 75% 乙醇浸泡 10 min, 无菌条件下取出双侧股骨, 剪去股骨两端, 用 10% 胎牛血清 DMEM 低糖培养基冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞, 加入 Ficoll 淋巴细胞分离液,  $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 min 后, 移液器吸取中间白色细胞层为有核细胞。将有核细胞层加入 D-hank's 液洗涤 2 次, 调细胞密度为  $3 \times 10^6$  个/mL 接种到含有 10% 胎牛血清与  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素,  $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素混合的 DMEM 低糖培养基中,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。48 h 后首次换液, 以后每隔 3 d 换液 1 次。待细胞生长达到 80% 以上融合, 均匀铺满培养瓶底时进行传代。一般 10 ~ 14 d 首次传代, 之后 7 d 左右传代 1 次, 取第 3 代细胞进行实验, 倒置显微镜下观察其形态。

**2.4 细胞处理及分组** 正常与肾性贫血 BMSCs 全部进行饥饿诱导自噬, 方法选用厄尔氏平衡盐溶液(EBSS)诱导方法<sup>[11]</sup>: 当第 3 代 BMSCs 处于对数生

长期, 弃原培养基, D-Hanks 漂洗, EBSS 培养液诱导细胞饥饿状态 1 h, 加入不同培养基继续培养 24 h, 正常组(正常大鼠 BMSCs 加 10% 胎牛血清培养); 模型组(肾性贫血大鼠 BMSCs 加 10% 胎牛血清); HDW 高剂量组(肾性贫血大鼠 BMSCs 加 10% 1 号血清), HDW 中剂量组(肾性贫血大鼠 BMSCs 加 10% 2 号血清), HDW 低剂量组(肾性贫血大鼠 BMSCs 加 10% 3 号血清)。

**2.5 MTT 法检测细胞存活率** 第 3 代 BMSC 以  $5 \times 10^3$  个/孔细胞接种于 96 孔板培养 24 h 以后, 按上述分组方法进行分组处理, 每组 6 个复孔, 加入含药血清培养 24 h 后, 弃培养液, 每孔加入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT  $10 \text{ } \mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 弃培养液, 加 DMSO  $150 \text{ } \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  震荡 30 min, 上酶标仪检测各组细胞在 570 nm 波长处的吸光度 *A*。细胞存活率按照公式<sup>[5]</sup>计算。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

**2.6 电子显微镜观察自噬小体** BMSCs 经饥饿诱导后依前法分组处理, 用细胞刮刀将贴壁细胞从培养瓶中轻轻刮下, 将含有细胞的培养基移入离心管,  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 吸取上清液, 2.5% 戊二醛固定。脱水、浸透、包埋、超薄切片制作等操作由山东省立医院微亚生物科技公司完成, 在透射电镜下观察自噬小体等细胞结构。

**2.7 Real-time PCR 法测定自噬相关基因 LC3 II, LC3 I, Beclin-1 mRNA 表达** 第 3 代 BMSCs 经饥饿诱导后分组, 每组 6 个样本, 给予不同处理, 继续培养 24 h。Trizol 法提取细胞总 RNA, Primer Premier 5.0 软件设计 LC3 I, LC3 II, Beclin-1 引物序列, 以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参, 引物序列见表 1。聚合酶链反应检测 LC3 I, LC3 II, Beclin-1 的表达并进行 3 次生物学重复。反应条件:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  3 min,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  7 s,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  10 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s, 共 35 个循环。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算各组目的基因与对照组 mRNA 的表达差异。

**2.8 培养液上清 BMSCs 旁分泌造血因子检测** 第 3 代 BMSCs 以  $2 \times 10^5$  个/孔细胞接种于 6 孔板, 饥饿诱导后分为以上 5 组, 每组重复 6 次, 分别予以不同培养基继续培养 24 h, 取离心后的培养上清液  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存, 用于下一步检测。ELISA 法使用大鼠 SCF, 大鼠 EPO, 大鼠 IGF-1 酶联免疫检测试剂盒分别对每组细胞培养上清液进行检测, 酶标仪  $450 \text{ nm}$  波长处测量各孔 *A*, 并根据吸光度在回归方程上计算出对应样品的浓度。

**2.9 自噬相关基因与细胞因子水平的典型相关分**

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称	引物序列	片段长度 /bp
β-actin	上游 5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'	163
	下游 5'-AGCCACCAATCCACACAGAG-3'	
LC3 I	上游 5'-CCATCGCTGACATCTATGAACA-3'	76
	下游 5'-GAAGTTTCTTGGGAGGCAT-3'	
LC3 II	上游 5'-CAGTCTTTGTAAGGGCGGTTTC-3'	218
	下游 5'-GATTCTCAGACACGAGTGAGTGAC-3'	
Beclin-1	上游 5'-AAGAATGGAGGGTCTAAGGC-3'	123
	下游 5'-TTCCTGAATGGTCACTCGGT-3'	

析 将自噬相关基因 LC3 I , LC3 II , LC3 II / LC3 I , Beclin-1 mRNA 水平设为第 1 组变量, 标记为  $x_1, x_2, x_3, x_4$ ; 培养上清中的细胞因子 SCF, EPO, IGF-1 设为第 2 组变量, 标记为  $y_1, y_2, y_3$ 。使用 SPSS 22.0 软件典型相关宏程序 Canonical Correlation. Sps 计算两组变量的典型相关系数、典型结构分析、绘制典型结构图及典型冗余分析。

2.10 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计, 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本均数比较采用  $t$  检验, 多个样本均数比较使用单因素方差分析, 方差齐性者组间两两比较选用 S-N-K (Newman Keuls 法), 方差不齐者使用 Dunnett's T3 分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 大鼠 BMSCs 培养 倒置显微镜下观察, 骨髓悬液第 1 天接种至培养瓶内时细胞呈圆形悬浮状, 数量较密集, 散见细胞团块。原代培养 7 d, 细胞呈椭圆形、少数呈梭形、多角形。经 2 次传代后, 第 3 代细胞培养 7 d 后呈典型的梭形、纺锤形, 呈漩涡状、菊花状排列生长, 均匀分布, 铺满视野, 相邻细胞甚至呈片状融合。正常大鼠 BMSCs 较肾性贫血大鼠生长更密集。见图 1。

3.2 对肾性贫血大鼠 BMSCs 细胞存活率的影响 模型组存活率为 100%, 远低于正常组 ( $176.51 \pm 10.20\%$ ), 二者比较差异有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 说明肾性贫血时 BMSCs 生长受抑制。相对于模型组, HDW 高、中、低剂量组对细胞的增殖都有促进作用, 相对存活率分别达到 ( $162.25 \pm 11.37\%$ ), ( $137.98 \pm 10.56\%$ ) 和 ( $112.03 \pm 8.48\%$ ), 且随剂量增高而增强。HDW 高、中剂量组与模型组比较明显提高 BMSCs 存活率, 差异有显

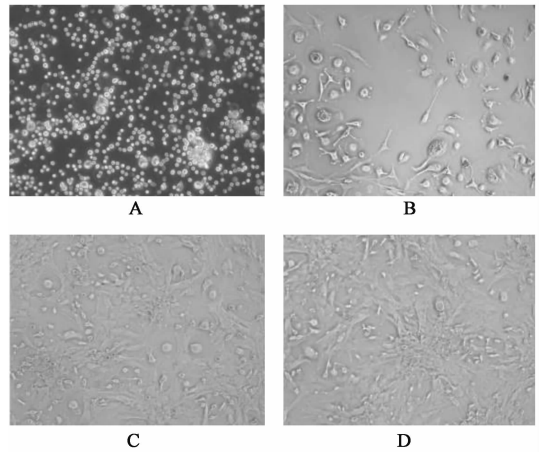


图 1 大鼠 BMSCs 培养(倒置显微镜,  $\times 200$ )  
A. 肾性贫血大鼠原代细胞培养第 1 天; B. 肾性贫血大鼠原代细胞培养第 7 天; C. 肾性贫血大鼠第 3 代 BMSCs; D. 正常大鼠第 3 代 BMSCs

图 1 大鼠 BMSCs 培养(倒置显微镜,  $\times 200$ )  
Fig.1 Cultivation of rat BMSCs(inverted microscope,  $\times 200$ )

著统计学意义 ( $P < 0.01$ ), HDW 低剂量组与模型组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

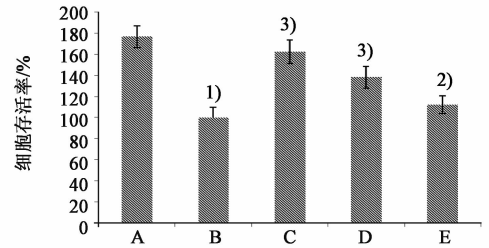


图 2 MSHDW 对大鼠 BMSCs 存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
A. 正常组; B. 模型组; C. HDW 高剂量组; D. HDW 中剂量组; E. HDW 低剂量组(图 3 同)。与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)

图 2 MSHDW 对大鼠 BMSCs 存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig.2 Effect of MSHDW on survival rate in rat BMSCs( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

3.3 对肾性贫血大鼠 BMSCs 自噬小体的影响 经饥饿诱导后细胞形态完整, 细胞核内有核仁结构, 细胞质内均可见自噬小体, 呈双层膜包裹的囊泡样结构。自噬初期双层膜结构包裹部分需要降解的细胞器形成“噬小体”(白箭头), 后期自噬小体与溶酶体融合形成“自噬溶酶体”进行底物的降解(黑箭头)。模型组自噬溶酶体明显多于正常组。与模型组比较, HDW 高、中、低剂量组自噬小体均减少。见图 3。

3.4 大鼠 BMSCs LC3 I , LC3 II , Beclin-1 mRNA 表达的影响 模型组各自噬相关基因 BMSCs LC3 I , LC3 II , Beclin-1 mRNA 表达均较正常组高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, HDW 高剂量组 BMSCs LC3 I , LC3 II , Beclin-1 mRNA 显著降低 ( $P < 0.01$ ); HDW 中剂量组与模型组比较差异有统计学意义

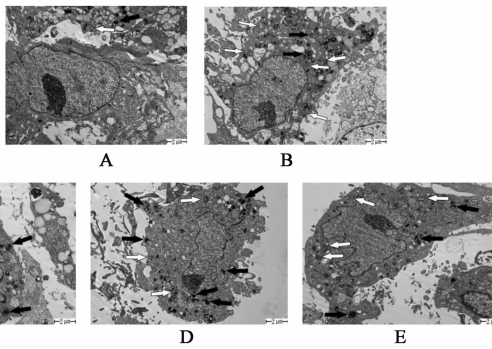


图 3 MSHDW 对肾性贫血大鼠 BMSCs 自噬小体的影响 (电镜扫描,  $\times 10\ 000$ )

Fig.3 Effect of MSHDW on autophagosome in rat BMSCs(SEM,  $\times 10\ 000$ )

表 2 MSHDW 对大鼠 BMSCs LC3 I ,LC3 II ,Beclin-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of MSHDW on expression of LC3 I ,LC3 II ,Beclin-1 mRNA in rat BMSCs( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/ $g \cdot mL^{-1}$	LC3 I	LC3 II	LC3 II /LC3 I	Beclin-1
正常	-	0.82 $\pm$ 0.04	0.70 $\pm$ 0.02	0.84 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.45
模型	-	1.29 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	1.82 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	1.26 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	1.62 $\pm$ 0.32 <sup>1)</sup>
HDW	2	0.84 $\pm$ 0.05 <sup>3)</sup>	0.73 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup>	0.87 $\pm$ 0.08 <sup>3)</sup>	0.94 $\pm$ 0.37 <sup>3)</sup>
	1	0.94 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	1.02 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	1.09 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>	1.36 $\pm$ 0.47 <sup>2)</sup>
	0.5	1.16 $\pm$ 0.39	1.52 $\pm$ 0.09	1.20 $\pm$ 0.03	1.31 $\pm$ 0.51

表 3 MSHDW 对肾性贫血大鼠 BMSCs 分泌 SCF,EPO,IGF-1 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of MSHDW on renal anemia rats' BMSCs secreting SCF, EPO and IGF-1 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/ $g \cdot mL^{-1}$	SCF/ $ng \cdot L^{-1}$	EPO/ $ng \cdot L^{-1}$	IGF-1/ $\mu g \cdot L^{-1}$
正常	-	1 039.09 $\pm$ 115.17	491.67 $\pm$ 40.83	361.83 $\pm$ 18.84
模型	-	488.67 $\pm$ 95.34 <sup>1)</sup>	214.33 $\pm$ 28.18 <sup>1)</sup>	147.50 $\pm$ 15.86 <sup>1)</sup>
HDW	2	1 073.33 $\pm$ 121.60 <sup>3)</sup>	461.83 $\pm$ 29.50 <sup>3)</sup>	308.50 $\pm$ 70.56 <sup>3)</sup>
	1	656.67 $\pm$ 57.50 <sup>2)</sup>	322.67 $\pm$ 25.55 <sup>2)</sup>	209.00 $\pm$ 8.02 <sup>2)</sup>
	0.5	455.00 $\pm$ 30.82	207.00 $\pm$ 14.05	163.00 $\pm$ 33.93

个简单相关系数矩阵只能作为参考,为了真实反映两组变量之间的实质关系,继续进行典型相关分析。图 5 显示,第 1 典型相关系数为 0.961,其检验  $P$  为 0.00,这对典型变量间的相关性有统计学意义,因此自噬基因和造血因子指标相关性研究可简化为研究第 1 对典型相关变量之间的关系。由图 6 推导出第 1 典型变量的计算公式为:  $u1 = 0.119x1 +$

( $P < 0.05$ ),HDW 低剂量组与模型组比较差异无统计学意义。见表 2。

3.5 对肾性贫血大鼠 BMSCs 旁分泌的影响 各组 BMSCs 培养上清均分泌 SCF,EPO 及 IGF-1。模型组 SCF,EPO 及 IGF-1 3 种造血因子水平明显低于正常组( $P < 0.01$ );HDW 高剂量组 3 种造血因子水平明显高于模型组( $P < 0.01$ );HDW 中剂量组 SCF,EPO 及 IGF-1 细胞因子水平高于模型组( $P < 0.05$ ),但 HDW 低剂量组与模型组比较无明显差异。见表 3。

3.6 自噬与旁分泌的典型相关分析 图 4 示  $x$  和  $y$  两组数据内部和之间均有较高的相关系数,但是这

$0.313x2 + 0.576x3 + 0.018x4; v1 = -0.084y1 - 0.733y2 - 0.206y3$ 。其中  $u1$  代表第 1 个典型变量,  $x1 \sim x4$  的系数均为正数,表明自噬基因水平越高则  $u1$  水平越高,故将  $u1$  解释为代表自噬水平的典型变量。而第 2 个典型变量公式中  $y1 \sim y3$  的系数均为负数,与  $v1$  均负相关,则  $v1$  解释为抑制 BMSCs 旁分泌的能力。典型结构分析(图 7,8)显示自噬水平组原始变量与典型变量  $u1$  均为正相关,相关系数均大于 0.7,抑制旁分泌能力组原始变量均与典型变量  $v1$  呈负相关,相关系数均大于 0.9。典型冗余分析(图 9)显示  $u1$  可以解释自己变量组 84.8% 的组内变差, $v1$  可以解释对立的  $u1$  178.3% 的变差; $v1$  能解释自己变量组 91.5% 的组内变异,对立的  $u1$  可以解释对立的  $v1$  184.4% 的变差。

#### 4 讨论

HDW 主要由 4 味中药组成:熟地黄、苍术、干姜、大枣,治疗肾性贫血作用显著,有效率达到

Correlations for Set-1				Correlations for Set-2			Correlations Between Set-1 and Set-2				
$x1$	$x2$	$x3$	$x4$	$y1$	$y2$	$y3$	$y1$	$y2$	$y3$		
$x1$	1.0000	.9518	.9055	.6964	$y1$	1.0000	.9185	.8861	$x1$ -.8557	-.9141	-.8334
$x2$	.9518	1.0000	.9279	.7495	$y2$	.9185	1.0000	.8924	$x2$ -.8803	-.9302	-.8744
$x3$	.9055	.9279	1.0000	.7231	$y3$	.8861	.8924	1.0000	$x3$ -.8902	-.9417	-.8898
$x4$	.6964	.7495	.7231	1.0000					$x4$ -.7151	-.7069	-.6990

图 4 自噬相关基因、造血因子指标内部及二者之间相关系数矩阵

Fig.4 Correlation matrix of autophagy related genes and hematopoietic factors

	Standardized Canonical Coefficients for Set-1			Standardized Canonical Coefficients for Set-2			
	1	2	3	1	2	3	
x1	.119	2.372	2.256	y1	-.084	1.091	-2.496
x2	.313	-1.184	-1.934	y2	-.733	-2.592	.758
x3	.576	-.395	-1.168	y3	-.206	1.660	1.703
x4	.018	-.948	1.185				

图 5 典型相关系数估计值和检验

Fig. 5 Canonical correlations and test results

CFU-F, CFU-E 及 CFU-GM 集落形成数均较对照组减少<sup>[13]</sup>, 因此笔者推论 HDW 可以通过影响 BMSCs 达到治疗肾性贫血的作用。

	Canonical Loadings for Set-1			Canonical Loadings for Set-2			
	1	2	3	1	2	3	
x1	.951	.228	.184	y1	-.940	.181	-.290
x2	.974	-.003	.018	y2	-.994	-.109	-.014
x3	.987	-.031	-.062	y3	-.935	.314	.168
x4	.752	-.469	.463				

图 7 自噬水平和抑制旁分泌能力组的典型结构分析

Fig. 7 Canonical loadings of autophagy group and side secretion group

	Canonical Loadings for Set-1			Canonical Loadings for Set-2			
	1	2	3	1	2	3	
x1	.951	.228	.184	y1	-.940	.181	-.290
x2	.974	-.003	.018	y2	-.994	-.109	-.014
x3	.987	-.031	-.062	y3	-.935	.314	.168
x4	.752	-.469	.463				

图 6 自噬基因指标与造血因子指标与典型变量间的标准化系数

Fig. 6 Standardized canonical coefficients of autophagy related genes or hematopoietic factors with canonical variables

80.56%<sup>[1]</sup>, 但是其作用机制尚不明确。基于该方药物组成及治疗“面青黄无常色”, 推断其有填髓益肾和生精血功效。有报道指出, CRF 患者造血微环境发生变化, 骨髓间质血窦变少, 骨髓各阶段幼红细胞数明显减少<sup>[12]</sup>, 尿毒症患者骨髓祖细胞体外培养

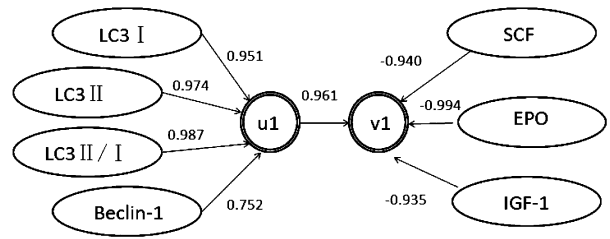


图 8 典型结构

Fig. 8 Diagram of canonical loadings

Proportion of Variance of Set-1 Explained by Its Own Can. Var.		Proportion of Variance of Set-1 Explained by Opposite Can. Var.	
Prop Var		Prop Var	
CV1-1	.848	CV2-1	.783
CV1-2	.068	CV2-2	.004
CV1-3	.063	CV2-3	.001

Proportion of Variance of Set-2 Explained by Its Own Can. Var.		Proportion of Variance of Set-2 Explained by Opposite Can. Var.	
Prop Var		Prop Var	
CV2-1	.915	CV1-1	.844
CV2-2	.048	CV1-2	.003
CV2-3	.038	CV1-3	.001

图 9 典型冗余分析

Fig. 9 Proportion of variance

自噬是哺乳动物细胞降解和回收利用细胞器的重要方式, 目前认为自噬对细胞的生理作用是双向的<sup>[14]</sup>: 既可以清除蛋白聚集和损伤的或多余的细胞器, 维持细胞内稳态, 发挥细胞保护作用, 维持细胞存活, 又可以在严重细胞损伤时诱导细胞死亡, 被称为“II 型程序性细胞死亡”。目前尚未见关于肾性贫血大鼠 BMSCs 自噬的相关报道, 对于其究竟是发挥细胞保护作用还是诱导死亡作用更不可知。本实验成功分离培养出正常大鼠与肾性贫血大鼠 BMSCs, 证实后者细胞生存率明显低于前者, 自噬小体明显增多, 自噬相关基因表达上升, 并且高剂量 MSHDW 处理后自噬基因明显低于模型组, 提示 BMSCs 自噬更有可能是诱导细胞死亡的途径之一。Beclin-1 是调节细胞自噬的关键基因<sup>[15]</sup>, 微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 是重要的自噬体标志性蛋白, 胞

质型 LC3 I 可转位到自噬体膜 LC3-II<sup>[16]</sup>, 因此 LC3-II 含量及 LC3-II/LC3-I 可反映自噬活性。本研究结果显示, MSHDW 可通过调节自噬相关基因 Beclin-1, LC3-I, LC3-II 抑制肾性贫血大鼠 BMSCs 自噬、提高细胞的生存率。

BMSCs 是造血微环境的重要组成部分, 能分泌多种细胞因子, 包括 SCF, EPO 及 IGF-1, 为干细胞分化提供营养和黏附<sup>[17]</sup>。已经证实, 因表面受体表达有差异, 不同发育阶段的红细胞对不同造血因子反应不同。比如 SCF 主要作用于早期红细胞, IGF-1 主要作用于晚期红细胞。EPO 对红系造血前体细胞的作用与 SCF 协同, 对后期红系造血细胞的作用与 IGF-1 协同<sup>[18]</sup>, 因此 SCF, EPO, IGF-1 均是影响红细胞生成的关键造血因子。本实验显示, 模型组 BMSCs 培养上清 EPO, SCF, IGF-1 水平均较正常组

下降,中、高剂量组 MSHDW 干预后,3 种造血因子水平明显提高,与模型组比较差异均有统计学意义,说明 HDW 有促进 BMSCs 旁分泌的作用。目前尚未见肾性贫血 BMSCs 自噬与分泌细胞因子能力之间关系的报道,需要进一步进行统计学验证。典型相关分析显示,自噬水平与抑制旁分泌的能力呈高度正相关,并且代表自噬能力和抑制旁分泌能力的变量组中,LC3 II/LC3 I 和 EPO 分别是最关键因子。

因此,HDW 治疗肾性贫血的机制可能是抑制 BMSCs 自噬水平达到促进其旁分泌作用,其主要途径为抑制 LC3 II/LC3 I 水平和提高 EPO 分泌水平。本研究为 HDW 治疗肾性贫血找到了新作用靶点,有利于全面研究其作用机制。

[参考文献]

[1] 王海燕. 肾脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:1912.  
[2] 张新辉. 中医药治疗肾性贫血近况[J]. 吉林中医药,2007,27(9):68-69.  
[3] 张凡珍,高伟,王芳,等. 黑地黄丸治疗肾性贫血的临床观察[J]. 甘肃中医学院学报,2006,26(3):15-17.  
[4] SONG C, SONG C, TONG F. Autophagy induction is a survival response against oxidative stress in bone marrow-derived mesenchymal stromal cells [J]. Cytotherapy,2014,16(10):1361-1370.  
[5] 景鹏伟,胡文煦,宋小英,等. 衰老大鼠模型骨髓基质细胞的生物学特点[J]. 解剖学报,2015,46(1):44-50.  
[6] 赵菊花. 圣愈汤传统煎剂和配方颗粒对骨髓抑制小鼠造血调控的实验研究[D]. 成都:成都中医药大学,2011.  
[7] Hokari M, Kuroda S, Shichinohe H, et al. Bone marrow

stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms[J]. J Neurosci Res,2008,86(5):1024-1035.  
[8] 李才. 人类疾病动物模型的复制[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:327.  
[9] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1872,1898.  
[10] 章静波. 组织和细胞培养技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2014:87,148.  
[11] 胡浩,孙伟,顾刘宝,等. 大黄素抑制 HBSS 诱导的肾小管上皮细胞自噬的分子机制[J]. 中国中药杂志,2015,40(10):1965-1970.  
[12] 王向杰,刘丽,刘键,等. 促红细胞生成素对慢性肾衰竭贫血患者骨髓超微结构的影响[J]. 解放军医药杂志,2011,23(6):3-5.  
[13] 景晔,徐和福,陆光生,等. 慢性肾衰贫血与骨髓无效造血相关性研究[J]. 中国临床医生,2013,41(8):40-42.  
[14] 成军. 现代细胞自噬分子生物学[M]. 北京:科学出版社,2011:7.  
[15] KANG R, Zeh H J, Lotze M T, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. Cell Death Differ,2011,18(4):571-580.  
[16] WEI K, WANG P, MIAO C Y. A double-edged sword with therapeutic potential: an updated role of autophagy in ischemic cerebral injury [J]. CNS Neurosci Ther,2012,18(2):879-886.  
[17] 罗成基,裴学涛. 造血微环境—基础与临床[M]. 香港:世界医药出版社,2001:4.  
[18] 张之南,郝玉书,赵永强,等. 血液病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:80-81,47.

[责任编辑 周冰冰]