

四物膏对再生障碍性贫血模型大鼠骨髓造血功能的影响

杜青¹, 何丹¹, 黄建华¹, 万丹¹, 苏艳红², 唐纯玉³, 陈林^{1*}

(1. 湖南省中医药研究院 中药研究所, 长沙 410006; 2. 湖南九典制药股份有限公司, 长沙 410011;
3. 湖南时代阳光药业股份有限公司, 湖南 永州 425006)

[摘要] 目的:探讨四物膏对再生障碍性贫血(AA)模型大鼠骨髓造血功能和Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路的调控作用。方法:SD大鼠随机分为正常组、模型组、阳性药(复方阿胶浆 $10.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、四物膏高、低剂量($22.68, 5.67\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,采用乙酰苯肼(APH)联合环磷酰胺(CTX)注射,建立AA大鼠模型,每天灌胃灌胃给予相应药物,连续15 d。检测大鼠外周白细胞(WBC),红细胞(RBC),血红蛋白(HGB),红细胞积压(HCT)和血小板(PLT)水平;计算比较胸腺和脾脏指数;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清白细胞介素-3(IL-3)和白细胞介素-6(IL-6)水平,苏木素-伊红(HE)染色观察骨髓病理形态学变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠股骨骨髓细胞中TLR4和NF- κ B蛋白及mRNA表达。结果:与正常组比较,模型组WBC,RBC,HGB,HCT和PLT水平明显降低,胸腺指数显著下降,脾脏指数显著增加,血清IL-3水平下降,IL-6水平升高,股骨骨髓中粒细胞和巨核细胞减少,髓腔内充填水肿的血管纤维脂肪组织,纤维化明显,骨髓细胞TLR4和NF- κ B蛋白及mRNA表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,四物膏高剂量组大鼠外周血细胞WBC,RBC,HCT和PLT水平增加,胸腺指数增加,脾脏指数减少,IL-3水平升高,IL-6水平下降,股骨骨髓病理形态轻微改善,骨髓细胞TLR4和NF- κ B蛋白及mRNA表达明显下降($P<0.05, P<0.01$)。结论:四物膏可能通过调控机体骨髓炎症信号通路TLR4/NF- κ B的表达,改善AA模型大鼠骨髓造血功能。

[关键词] 四物膏; 再生障碍性贫血(AA); 骨髓; Toll样受体4(TLR4); 核转录因子- κ B(NF- κ B)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)03-0092-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202405

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201126.1313.006.html>

[网络出版日期] 2020-11-26 15:07

Effect of Siwu Paste on Hematopoietic Function of Bone Marrow in Rats with Aplastic Anemia and Its Mechanism

DU Qing¹, HE Dan¹, HUANG Jian-hua¹, WAN Dan¹, SU Yan-hong², TANG Chun-yu³, CHEN Lin^{1*}

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Institute of Chinese Medicine, Changsha 410006, China;
2. Hunan Jiudian Pharmaceutical Co. Ltd., Changsha 410011, China;
3. Hunan Timesun Pharmaceutical Co. Ltd., Yongzhou 425006, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the regulatory effect of Siwu paste on the bone marrow hematopoietic function of aplastic anemia (AA) model rats. **Method:** SD rats were randomly divided into normal control group, model group, positive drug (Fufang E'jiao Jiang $10.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, high-dose Siwu paste ($22.68\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group and low-dose Siwu paste ($5.67\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group. Acetophenazine (APH) combined with cyclophosphamide (CTX) injection was used to establish the aplastic anemia rat model. The administration

[收稿日期] 20201025(005)

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2019JJ50345,2020JJ5325,2020JJ5328);湖南省中医药研究院重点项目(201803,201805);长沙市科技计划项目(kq1901067);长沙市杰出创新青年培养项目(kq1802017);中医方证研究转化医学湖南省重点实验室开发基金项目(2019FZ08)

[第一作者] 杜青, 硕士, 实习研究员, 从事中药药理与创新药物研究, E-mail: 791166938@qq.com

[通信作者] * 陈林, 硕士, 助理研究员, 从事中药质量控制与分析研究, E-mail: 635711793@qq.com

groups were given the corresponding drugs (*ig*) for 15 consecutive days. The levels of white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT) and platelets (PLT) in peripheral blood cells of rats were detected, thymus and spleen indexes were calculated and compared. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of interleukin-3 (IL-3) and interleukin-6 (IL-6) in rat serum. The pathological changes of bone marrow were observed by hematoxylin eosin (HE) staining. Western blot and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) methods were used to detect Toll receptor 4 (TLR4) and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) protein and gene expression in rat femoral bone marrow cells. **Result:** Compared with the normal control group, the WBC, RBC, HGB, HCT and PLT levels of the model group were significantly reduced, the thymus index was significantly decreased, the spleen index was significantly increased, the serum IL-3 level was significantly decreased, and the IL-6 level was significantly increased. The number of neutrophils and megakaryocytes in the femoral bone marrow was reduced, and the medullary cavity was filled with edema fibrofatty tissue. The expressions of TLR4 and NF- κ B protein and mRNA in bone marrow cells were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the levels of WBC, RBC, HCT and PLT in peripheral blood cells of rats in the high-dose Siwu paste group increased, the thymus index increased, the spleen index decreased, the IL-3 level was significantly increased, the IL-6 level was significantly decreased, the pathological morphology of femoral bone marrow was slightly improved, and the expressions of TLR4 and NF- κ B protein and mRNA in bone marrow cells decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Siwu paste may improve the bone marrow hematopoietic function of rats with aplastic anemia by regulating the expression of the bone marrow inflammation signal pathway TLR4/NF- κ B.

[Key words] Siwu paste; aplastic anemia; bone marrow; Toll receptor 4 (TLR4); nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)

化疗诱导的再生障碍性贫血(AA)主要表现为一种自身免疫和骨髓破坏性疾病,由异常活化的T淋巴细胞及其分泌的淋巴因子介导,多伴随着机体红细胞数量减少,血红蛋白浓度降低,免疫功能下降等症状,严重影响着人类的生存健康^[1]。目前,西医治疗主要采用免疫抑制、造血刺激因子等,皆存在一定的毒副作用,中药因其良好的补血作用,特别是对骨髓抑制所致的造血功能异常方面有较好的疗效,且副作用少,而引起了广泛的关注^[2-3]。四物膏是传统中医临床常用的经典补血民方,源于《仙授理伤续断秘方》,据报道,四物膏的主要化合物包括酚酸、苯酞、异苯并呋喃、环烯醚萜苷和黄酮等^[4],可增加贫血诱导大鼠的血红蛋白,血细胞比容和红细胞水平^[5],并上调成年兔血管内皮生长因子的表达^[6],还可直接作用于骨髓细胞,缓解放化疗引起的骨髓抑制而发挥补血作用^[7],但具体作用机制,至今尚未明确。Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号轴被认为是促炎因子产生的主要途径,在激活后,大多数促炎因子从骨髓细胞释放,从而影响骨髓细胞生长、分化,导致造血功能异常^[8]。本课题组采用乙酰苯肼联合环磷酸胺复制了

AA大鼠模型,并采用苏木素-伊红(HE)染色,蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)等探讨四物膏是否通过机体免疫调节,调控骨髓细胞TLR4/NF- κ B信号轴表达,保护化疗诱导骨髓造血细胞损伤,以期为临床治疗提供新的靶点。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,30只,雄性,SPF级,体质量(180~220)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。实验单位使用许可证号SYXK(湘)2015-0008,实验动物合格证号43004700058820。实验程序根据湖南省中医药研究院实验动物中心进行,所有程序均按照中国科学技术部制定的“实验动物护理和使用指导意见”进行,批准编号20190030。允许大鼠在恒定温度、湿度和光暗循环(22±2)℃;(55±10)%;07:00—19:00光照循环下自由饮水和食物。

1.2 仪器 RM2245轮转式切片机(德国Leica公司);奥林巴斯BX53型生物显微镜(日本Olympus公司);7DZ5-WS型低温低速离心机(湖南湘仪实验仪器公司);ABI7500型Real-time PCR仪(美国Thermo公司);DYY-6C型电泳仪,DYCP-31DN型

水平琼脂糖电泳槽(中国北京六一);ChemiDoc™ XRS+型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);Trilogy II型生化分析仪(新西兰Trilogy公司);envision2105型酶标仪(秘鲁PE公司)。

1.3 药物与试剂 四物膏(批号190303167,规格250 g/瓶),湖南九典制药股份有限公司,由熟地黄、当归、白芍、川芎4味药组成,配比为15:10:10:6,临床使用剂量 $63\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,按照临床等效剂量换算成本实验动物等效剂量即四物膏低剂量($5.67\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和4倍使用剂量四物膏高剂量($22.68\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$);复方阿胶浆(批号171102),东阿阿胶股份有限公司,临床使用剂量 $60\text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$,按照临床等效剂量换算成本实验动物使用剂量即 $10.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。注射用环磷酰胺(百特国际有限公司,批号8H259A);乙酰苯肼(美仑生物技术有限公司,批号A0310A);伊红,苏木素(上海华蓝生物科技公司,批号分别为17372-87-1,517-28-2);白细胞介素-3(IL-3)和IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号分别为JM-01500R1,JM-01597R1);TLR4,NF- κ B一抗(北京Bioswamp公司,批号分别为PAB33926,PAB33379); β -肌动蛋白(β -actin)一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔,HRP标记山羊抗大鼠(Servicebio公司,批号分别为GB12001,GB23303,GB23302);trizol(Ambion公司,批号139501);mRNA逆转录试剂盒(中国北京康为世纪,批号CW2569)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 将SD大鼠按照体质量随机分为正常组、模型组、复方阿胶浆($10.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、四物膏高、低剂量($22.68, 5.67\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组6只。按照参考文献[9]的方法进行AA模型复制,除正常组外,其余各组第1天皮下注射2%乙酰苯肼生理盐水溶液($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),第4天皮下注射2%乙酰苯肼生理盐水溶液($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),2 h后以及第5,6,7天腹腔内注射环磷酰胺生理盐水溶液($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。各给药组大鼠均灌胃给予相应药物,正常组和模型组大鼠灌胃给予相同体积纯净水,连续给药15 d。

2.2 样本采集 大鼠末次给药1 h后,10%水合氯醛($3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉,腹主动脉取1 mL全血于抗凝管中待用,取4 mL全血于促凝管中,离心($3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,15 min)取上清液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用。取胸腺和脾脏称质量,左侧股骨保存于4%的多聚甲醛固定液中,右侧股骨保存于液氮中,待用。

2.3 脏器指数测定 解剖取出胸腺和脾脏,称定质

量并计算各脏器指数。脏器(胸腺、脾脏)指数=脏器(胸腺、脾脏)质量(mg)/动物体质量(g)。

2.4 全自动血细胞分析仪检测外周血细胞指标水平 上述抗凝管中全血1 mL中加入溶血剂,采用全自动血细胞分析仪,按照仪器SOP进行操作,检测外周血细胞数量,主要包括外周血中白细胞计数[WBC($\times 10^9$)个/L],红细胞计数[RBC($\times 10^{12}$)个/L],血红蛋白(HGB/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),红细胞压积(HCT)和血小板计数[PLT($\times 10^9$)个/L]5项指标变化。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色检测股骨髓组织形态学变化 取浸泡于固定液(每4%的多聚甲醛100 mL含EDTA-2K 5.5 g,可起固定脱钙作用)中完整股骨, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下存放15~20 d后,常规石蜡包埋,5 μm 处切片,HE染色,光学显微镜下观察骨髓细胞形态结构变化。

2.6 ELISA检测血清炎症因子水平 取冻存的血清样本,按照ELISA试剂盒说明书,检测各组大鼠血清中IL-3和IL-6水平。

2.7 Western blot检测股骨髓细胞TLR4/NF- κ B蛋白表达 取冻存的股骨组织,在磷酸盐缓冲溶液(PBS) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冲洗后,用刀片除去每块骨的骨髓,用PBS冲洗股骨髓,离心收集细胞。加入含有1% PMSF的RIPA裂解液。裂解30 min后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,收集上清液。BCA蛋白定量试剂盒测定样品中的蛋白浓度后,电泳,转膜,封闭,孵育。显色,凝胶成像系统扫描分析。以 β -actin蛋白表达水平作为内参,以各样本与相应内参灰度值比值为蛋白相对含量。

2.8 Real-time PCR检测股骨髓细胞TLR4/NF- κ B mRNA表达 取冻存股骨,按照上述方法提取骨髓细胞,加入trizol 1 mL,裂解5 min,提取组织样本总RNA,采用琼脂糖凝胶电泳进行定性,核酸蛋白测定仪测定260/280 nm处吸光度 A ,进行定量。按照逆转录反应试剂盒说明书,合成cDNA。每个样本设置3个孔,PCR反应体系为 $2\times$ SYB GREEN PCR Master Mix 15 μL , ddH₂O 11 μL ,上下游引物($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各1 μL ,cDNA 1 μL 。扩增条件为合酶活化 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,40个循环。以 β -actin为内参,反应结束后以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算分析目的基因TLR4,NF- κ B mRNA相对表达水平。TLR4,NF- κ B PCR上下游引物,购自上海生物工程技术服务有限公司,引物序列见表1。

2.9 统计学处理 数据分析采用统计软件SPSS 17.0,所有计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间采用单因素方

表1 TLR4和NF-κB引物序列

Table 1 TLR4 and NF-κB primer sequences

引物	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	长度/bp
TLR4	GGCTTCTAACCTCAACGACCT	ATGATTCTTTGCCTGAGTTGCTT	112
NF-κB	CACCAAAGACCCACCTCACCG	CTTGCTCCAGGTCTCGCTTC	155
β-actin	ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	223

差分析(One-way-ANOVA), *t* 检验, 双侧检验, 两两比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对AA大鼠脏器指数的影响 与正常组比较, 模型组大鼠的胸腺指数显著下降, 脾脏指数显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 复方阿胶浆组和四物膏高剂量组胸腺指数明显升高, 脾脏指数明显下降($P < 0.05, P < 0.01$), 四物膏低剂量组胸腺和脾脏指数无明显变化。见表2。

3.2 对AA大鼠外周血细胞的影响 与正常组比较, 模型组WBC, RBC, HGB, HCT和PLT水平均明显下降($P < 0.01$); 与模型组比较, 在给予四物膏后,

表2 四物膏对AA大鼠脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Siwu paste on rat organ index of AA rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	胸腺指数	脾脏指数
正常		1.92±0.18	2.83±0.54
模型		1.10±0.23 ¹⁾	4.26±0.40 ¹⁾
复方阿胶浆	10.8	1.49±0.19 ³⁾	3.55±0.68 ²⁾
四物膏	22.68	1.42±0.20 ²⁾	3.36±0.40 ³⁾
	5.67	1.21±0.15	3.88±0.33

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表3~6同)

WBC, RBC, HCT和PLT水平出现剂量依赖式升高($P < 0.05, P < 0.01$)。见表3。

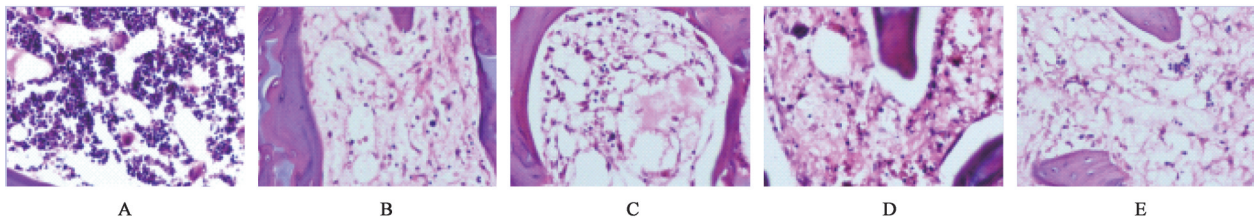
表3 四物膏对AA大鼠外周血细胞的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Siwu paste on peripheral blood cells of AA rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	WBC($\times 10^9$)个/L	RBC($\times 10^{12}$)个/L	HGB/g·L ⁻¹	HCT/L·L ⁻¹	PLT($\times 10^9$)个/L
正常		8.03±0.40	7.48±0.36	159.33±5.92	46.47±2.74	1 162.00±141.96
模型		2.11±0.19 ¹⁾	3.65±0.29 ¹⁾	71.67±5.71 ¹⁾	24.73±2.22 ¹⁾	681.50±38.17 ¹⁾
复方阿胶浆	10.8	2.56±0.39 ²⁾	4.13±0.28 ²⁾	78.00±4.29 ²⁾	25.94±2.84	759.00±69.76 ²⁾
四物膏	22.68	2.43±0.18 ²⁾	4.15±0.31 ²⁾	74.50±5.21	29.15±1.74 ³⁾	722.33±25.62 ²⁾
	5.67	2.29±0.21	3.81±0.45	72.50±4.23	26.92±3.82	695.83±24.43

3.3 对AA大鼠股骨骨髓病理形态学的影响 正常组大鼠股骨骨膜、髓腔和软骨组织结构清晰, 髓腔内可见丰富的细胞成分(粒细胞、巨核细胞、有核细胞等), 未见脂肪细胞和纤维组织; 模型组粒细胞和

巨核细胞减少, 但髓腔内充填水肿的血管纤维脂肪组织, 纤维化明显; 相比模型组, 复方阿胶浆组和四物膏高剂量组对骨髓抑制情况有轻微的改善作用, 存在少量造血细胞增生现象。见图1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 复方阿胶浆组; D. 四物膏高剂量组; E. 四物膏低剂量组(图2同)

图1 四物膏对化药所致AA大鼠股骨骨髓病理形态学的影响(HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Siwu paste on pathological morphology of femoral bone marrow in AA rats induced by chemical drugs (HE, $\times 400$)

3.4 对AA大鼠血清中IL-3和IL-6水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清中IL-3水平显著

下降, IL-6水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 四物膏高剂量组大鼠血清中IL-3水平明显升高,

IL-6水平明显降低($P<0.05$)。见表4。

表4 四物膏对AA大鼠血清中IL-3和IL-6水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 4 Effect of Siwu paste on levels of IL-3 and IL-6 in serum of AA rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-3	IL-6
正常		24.23±4.22	98.70±27.94
模型		12.66±4.13 ¹⁾	159.63±23.14 ¹⁾
复方阿胶浆	10.8	18.43±3.95 ²⁾	118.61±24.09 ²⁾
四物膏	22.68	19.55±3.62 ²⁾	125.54±20.33 ²⁾
	5.67	18.34±4.23 ²⁾	142.32±28.90

3.5 对AA大鼠股骨骨髓中TLR4/NF-κB蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠骨髓细胞内TLR4和NF-κB蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,复方阿胶浆组和四物膏治疗组大鼠骨髓细胞内TLR4和NF-κB蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表5,图2。

表5 四物膏对AA大鼠股骨骨髓中TLR4和NF-κB蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Siwu paste on expression of TLR4 and NF-κB protein in femoral bone marrow of AA rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4/β-actin	NF-κB/β-actin
正常		0.032 7±0.001	0.027 6±0.001
模型		0.054 6±0.001 ¹⁾	0.371 8±0.004 ¹⁾
复方阿胶浆	10.8	0.049 6±0.003 ²⁾	0.245 9±0.005 ³⁾
四物膏	22.68	0.044 6±0.002 ³⁾	0.171 0±0.002 ³⁾
	5.67	0.073 5±0.002	0.352 6±0.008

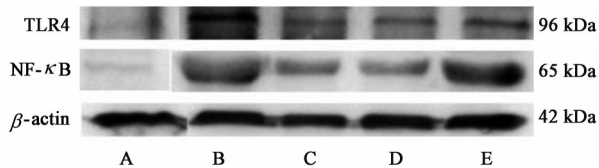


图2 各组大鼠股骨骨髓中TLR4和NF-κB蛋白电泳
Fig. 2 Electrophoresis of TLR4 and NF-κB protein in femoral bone marrow of rats in each group

3.6 对AA大鼠股骨骨髓中TLR4/NF-κB mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠股骨骨髓中TLR4和NF-κB mRNA的表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,四物膏干预组大鼠股骨骨髓中TLR4和NF-κB mRNA的表达明显降低($P<0.05$)。见表6。

4 讨论

全世界约有43%的儿童和33%的未怀孕妇女患有贫血症,这是一个特别常见的公共卫生问题,

表6 四物膏对AA大鼠股骨骨髓中TLR4和NF-κB mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Siwu paste on expression of TLR4 and NF-κB mRNA in femoral bone marrow of AA rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4	NF-κB
正常		1.115 3±0.139 4	1.168 7±0.309 0
模型		3.173 9±0.586 4 ¹⁾	4.947 4±0.601 6 ¹⁾
复方阿胶浆	10.8	2.112 6±0.318 8 ²⁾	3.142 5±0.476 2 ²⁾
四物膏	22.68	1.927 9±0.385 8 ²⁾	3.727 2±0.307 5 ²⁾
	5.67	2.613 6±0.329 8	4.019 8±0.624 5

严重威胁着人类的生命和健康^[10]。贫血的发病机制是由多种因素引起的,其中,AA是一种难治性血液综合征,以骨髓造血功能衰竭和全身性血细胞减少为主要特征^[11]。目前,无论是标准免疫抑制治疗还是造血干细胞移植治疗都存在耗费大、风险高、适应人群有限等缺点,中医药广泛使用活血化瘀治疗贫血,可以进行多环节、多靶点调控,有效提高患者生存质量。四物膏由4种草药组成,君药熟地黄甘温味厚、长于补血滋阴,填精益髓,臣药当归甘、辛温,补血活血,佐以白芍养血柔肝、川芎活血行气,主治营血虚滞证,是补血、活血、调经之良方^[12]。有文献报道,四物汤能够通过调节免疫学,细胞凋亡, DNA损伤修复等血清蛋白,改善患者贫血症状^[13];还能够有效改善环磷酰胺致AA模型大鼠红细胞膜ATP酶活性,调节外周血象,发挥良好的补血功效^[14]。

目前,有关贫血症的动物模型的造模方法主要包括放血法,环磷酰胺化疗损伤法,⁶⁰Co辐射法,乙酰苯肼和环磷酰胺复合法等,本实验选用了与临床表现比较一致的乙酰苯肼联合环磷酰胺复合法来复制AA动物模型,发现四物膏可以在一定程度上改善AA大鼠血细胞减少情况。脾脏是人体最常见的免疫造血器官之一,缺乏造血功能会导致脾脏中骨髓细胞的积聚,这将进一步增加脾脏的质量并损害人体的免疫功能^[15]。炎症因子IL-3是多克隆造血生长因子,是免疫系统调节造血系统的主要成分,主要作用于早、中期造血祖细胞的增殖和分化^[16]。IL-6作为由骨髓基质细胞分泌的细胞因子,是调节免疫应答、急性期反应和造血的细胞因子,在很低的浓度下即可导致造血祖细胞死亡^[17-18]。IL-6也可以与IL-3协同作用,以刺激巨核细胞DNA蛋白质的合成,并促进巨核细胞向成熟血小板的增殖^[19]。本研究结果显示,AA模型动物脏器指数显著改变,IL-3分泌明显下降,IL-6分泌增多,给予四

物膏治疗后,上述指标出现明显逆转,免疫造血器官胸腺和脾脏指数呈现正常化趋势,说明四物膏在AA引起的机体免疫紊乱,以及补血方面起到积极地作用。

骨髓是由不同成熟阶段的造血细胞组成的最重要的造血器官,环磷酰胺可导致造血微环境损伤,尤其是骨髓造血细胞的损伤,从而导致骨髓造血重建功能障碍。TLR是参与先天免疫的一类重要蛋白,可以识别病原体并产生免疫细胞应答,在免疫炎症反应的诱导和调节过程中发挥主要功能。TLR4是TLR家族中重要的一员,在骨髓中大量存在,TLR4信号的激活可影响骨髓基质细胞的存活、分化、增殖、迁移和促炎性细胞因子的分泌^[20]。TLR4的激活能够触发NF- κ B的核翻译,NF- κ B二聚体释放,NF- κ B广泛存在于骨髓、胸腺,并在促进造血和调节免疫功能上扮演了重要角色^[21-23]。其参与调节和免疫相关的淋巴系和髓系细胞(包括T细胞,B细胞,巨噬细胞,树突状细胞,各种粒细胞等)的增殖和分化过程^[24],还可调节多种造血因子,包括IL-2,IL-6等。有文献报道,激活NF- κ B信号途径可使抗凋亡基因表达减少,造血干细胞凋亡,导致造血障碍^[25]。本研究显示,四物膏可适当减少化疗诱导的骨髓抑制大鼠的骨髓病理损伤,减少骨髓内增生的脂肪细胞,增加红细胞量,改善骨髓血细胞损伤;Western blot和Real-time PCR发现,模型组大鼠骨髓中TLR4和NF- κ B蛋白和mRNA表达明显升高,给予药物治疗后,皆出现一定的逆转。低剂量四物膏干预后,对于改善AA大鼠造血功能效果不理想,可能由于动物个体差异造成低剂量组TLR4蛋白比模型组更高,但这个结果不影响本实验研究最终结论。因此,有理由认为TLR4/NF- κ B炎症信号通路可能与AA骨髓造血障碍有关。本研究结果不仅提供了四物膏如何发挥其免疫调节作用,而且通过差异调节相关信号传导途径,为临床治疗AA提供一定的理论基础。同时,该研究仅集中于骨髓造血细胞免疫相关指标,而影响骨髓造血功能的其他指标正在研究中,需要进一步阐明。

[参考文献]

[1] WANG L, LIU H. Pathogenesis of aplastic anemia[J]. Hematology, 2019, 24(1): 559-566.
[2] CHEN Y, ZHU B, ZHANG L, et al. Experimental study of the bone marrow protective effect of a traditional Chinese compound preparation [J].

Phytother Res, 2009, 23(6): 823-826.

[3] QI F, LI A, INAGAKI Y, et al. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemoradiotherapy for cancer [J]. Biosci Trends, 2010, 4(6): 297-307.
[4] SU S, CUI W, ZHOU W, et al. Chemical fingerprinting and quantitative constituent analysis of Siwu decoction categorized formulae by UPLC-QTOF/MS/MS and HPLC-DAD [J]. Chin Med, 2013, 8(1): 5.
[5] YUNAN T, YUKE X, GUORAN W, et al. Effects and mechanisms of Bazhen decoction, Siwu decoction, and Sijunzi decoction on 5-fluorouracil-induced anemia in mice [J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(4): 486-495.
[6] QI Z, LEI C. Effect of Chinese drugs for promoting blood circulation and eliminating blood stasis on vascular endothelial growth factor expression in rabbits with glucocorticoid-induced ischemic necrosis of femoral head [J]. J Trad Chin Med, 2009, 29(2): 137-140.
[7] HE Y, GAO T, LI J, et al. Metabonomics study on the effect of Siwu Decoction for blood deficiency syndrome in rats using UPLC-Q/TOF-MS analysis [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 32(2): e4617.
[8] SON S, SHIM D W, HWANG I, et al. Chemotherapeutic agent paclitaxel mediates priming of NLRP3 inflammasome activation [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1108.
[9] LI S J, LIN H, QU C, et al. Urine and plasma metabonomics coupled with UHPLC-QTOF/MS and multivariate data analysis on potential biomarkers in anemia and hematinic effects of herb pair Gui-Hong [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 170: 175-183.
[10] GHEITH I, EL-MAHMOUDY A. Laboratory evidence for the hematopoietic potential of Beta vulgaris leaf and stalk extract in a phenylhydrazine model of anemia [J]. Braz J Med Biol Res, 2018, 51(11): e7722.
[11] BAR C, POVEDANO J. M, SERRANO R, et al. Telomerase gene therapy rescues telomere length, bone marrow aplasia, and survival in mice with aplastic anemia [J]. Blood, 2016, 127(14): 1770-1779.
[12] 何然,汪宏锦,周莹,等. 四物汤对幼鼠缺铁性贫血的改善及其对铁代谢的调节作用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(5): 944-950.
[13] 杨明会,马增春,窦永起,等. 四物汤对血虚证患者血清蛋白质的影响 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 420-423.
[14] 朱敏,段金殿,唐于平,等. 采用化学药物联合致小鼠

- 血虚模型评价四物汤及其配伍组成的作用特点[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18):2543-2547.
- [15] ZHANG Z, ZHANG Y, GAO M, et al. Steamed *Panax notoginseng* attenuates anemia in mice with blood deficiency syndrome via regulating hematopoietic factors and jak-stat pathway [J]. Front Pharmacol, 2020, 10(1):1578.
- [16] LIM J, JEONG S J, KOH W, et al. JAK2/STAT5 signaling pathway mediates Bojungbangdocktang enhanced hematopoiesis [J]. Phytother Res, 2011, 25(3):329-337.
- [17] EL MAHGOUB I R , AFIFY R A A, BOTROS S K A, et al. Immunoregulatory cytokines gene polymorphisms in Egyptian patients affected with acquired aplastic anemia [J]. Ann Hematol, 2014, 93(6):923-929.
- [18] BELAIDCHOUCAIR Z, LEPELLETIER Y, PONCIN G. Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition [J]. Stem Cells, 2008, 26(6):1556-1564.
- [19] ZHANG H, WANG H. F, LIU Y, et al. The haematopoietic effect of *Panax japonicus* on blood deficiency model mice [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3):818-824.
- [20] HE X, WANG H, JIN T, et al. TLR4 activation promotes bone marrow MSC proliferation and osteogenic differentiation via Wnt3a and Wnt5a signaling[J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0149876.
- [21] DENK A, WIRTH T, BAUMANN B. NF- κ B transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11(4):303-320.
- [22] WANG D, PAZ-PRIEL I, FRIEDMAN A D. NF- κ B p50 regulates C/EBP α expression and inflammatory cytokine-induced neutrophil production [J]. J Immunol, 2009, 182(9):5757-5762.
- [23] GERONDAKIS S, BANERJEE A, GRIGORIADIS G, et al. NF- κ B subunit specificity in hemopoiesis [J]. Immunol Rev, 2012, 246(1):272-285.
- [24] HAYDEN M S, GHOSH S. NF- κ B in immunobiology [J]. Cell Res, 2011, 21(2):223-244.
- [25] TANG M, WEI X, GUO Y, et al. TAK1 is required for the survival of hematopoietic cells and hepatocytes in mice [J]. J Exp Med, 2008, 205(7):1611-1619.

[责任编辑 周冰冰]