

穿龙薯蓣皂苷对再生障碍性贫血小鼠 PPAR γ , C/EBP α 及脂肪分泌因子表达的影响

张珊¹, 尹立祥², 王爱迪¹, 宋新龙², 张乐¹, 刘宝山^{1*}

(1. 天津医科大学总医院, 天津 300052; 2. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193)

[摘要] 目的: 观察穿龙薯蓣皂苷对再生障碍性贫血小鼠的治疗作用及其对过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ), CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT-enhancer binding protein α , C/EBP α), 脂联素 (Adiponectin), 瘦素 (Leptin) 的影响, 探究其在骨髓间充质干细胞脂肪化过程中发挥效应的可能机制。方法: BALB/c 小鼠随机分为正常组及模型组, 模型组小鼠经⁶⁰Coy 照射联合尾静脉输注 DBA/2 小鼠淋巴细胞混悬液法造模。模型评估成功后, 将成模小鼠随机分为 6 组, 分别为模型组, 穿龙薯蓣皂苷低、中、高剂量组 (37.44, 74.88, 149.76 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 环孢素组 (23.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 雷公藤多苷组 (9.36 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 相应药物灌胃 14 d。干预完成后, 检测各组小鼠外周血象并制作骨髓细胞涂片评价骨髓增生情况。采用贴壁法分离培养各组小鼠骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 并进行成脂诱导; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR), 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组小鼠 BMMSCs 中 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin mRNA 和蛋白表达。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠外周血白细胞 (white blood cell, WBC), 血红蛋白 (hemoglobin, HGB), 血小板 (blood platelet, PLT) 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组小鼠血象均有不同程度回升, 以穿龙薯蓣中剂量组最优 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组小鼠 BMMSCs 中 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin mRNA 和蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组小鼠上述指标均被不同程度抑制, 其中穿龙薯蓣皂苷中剂量组和环孢素组 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin mRNA 和蛋白表达明显下调, 优于雷公藤多苷组 ($P < 0.05$)。结论: 穿龙薯蓣皂苷能够促进再障小鼠外周血象恢复, 改善骨髓造血。穿龙薯蓣皂苷可抑制 AA 小鼠 BMMSCs PPAR γ , C/EBP α 的表达, 减少脂肪细胞分泌的 Adiponectin, Leptin, 进而有效地抑制 BMMSCs 向脂肪细胞的过度分化。

[关键词] 再生障碍性贫血; 穿龙薯蓣皂苷; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ); CCAAT 增强子结合蛋白 α (C/EBP α); 瘦素; 脂联素

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0126-09

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20190503

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181119.0946.003.html>

[网络出版时间] 2018-11-21 09:52

Effect of Diosgenin on Expressions of PPAR γ , C/EBP α and Adipokine Secretion in Aplastic Anemia Mice

ZHANG Shan¹, YIN Li-xiang², WANG Ai-di¹, SONG Xin-long², ZHANG Le¹, LIU Bao-shan^{1*}

(1. General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China;

2. Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of diosgenin on aplastic anemia (AA) mice and peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT-enhancer binding protein α (C/EBP α), Adiponectin, Leptin, in order to discuss the potential mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells in the process of adipemia.

Method: BALB/c mice were randomly divided into control group and model group. The model group was

[收稿日期] 20180729(006)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81774062, 81173415); 天津医科大学“十三五”综合投资学科建设项目(11601502-XK0135)

[第一作者] 张珊, 在读硕士, 从事中西医结合血液病研究, E-mail: 1174677183@qq.com

[通信作者] * 刘宝山, 博士生导师, 教授, 从事中西医结合血液病研究, E-mail: j33387@qq.com

established by ^{60}Co irradiation combined with tail vein infusion with lymphatic suspension cells of DBA/2 mice. After successful evaluation of the model, the mice were randomly divided into 6 groups: model group, low, medium and high-dose diosgenin groups ($37.44, 74.88, 149.76 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), cyclosporine group ($23.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and tripterygium glycoside group ($9.36 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and given corresponding drugs by gavage for 14 days. After the intervention, the peripheral blood of mice in each group was detected, and bone marrow smears were collected to evaluate the proliferation of bone marrow. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) were isolated and cultured by adherent method and induced by adipogenesis. The mRNA and protein expressions of PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin in BMMSCs were detected by quantitative real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** The white blood cell (WBC), hemoglobin (HGB) and blood platelet (PLT) in peripheral blood of model group were significantly lower than those of normal group ($P < 0.05$). The hemogram of each treatment group was higher than that of model group to varying degrees. The middle-dose Dioscorea nipponica group had the most obvious hemogram, with statistically significant differences compared with the model group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the mRNA and protein expressions of PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin and Leptin in BMMSCs of the model group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the above indexes in the treatment groups were all decreased, the mRNA and protein expressions of PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin and Leptin in the middle-dose group diosgenin decreased obviously, which was better than those of Tripterygium glycoside group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Diosgenin can promote the recovery of peripheral blood in aplastic anemia mice and improve the hematopoiesis of bone marrow. Diosgenin can reduce the expressions of PPAR γ and C/EBP α , the formation of adipocytes and the secretion of Adiponectin and Leptin in adipocytes, and effectively inhibit the process of adipose tissue derived from bone BMMSCs.

[**Key words**] aplastic anemia; diosgenin; peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ); CCAAT-enhancer binding protein α (C/EBP α); Leptin; Adiponectin

再生障碍性贫血 (aplastic anemia, AA) 简称再障,是由多病因引起的骨髓造血功能衰竭、全血细胞减少的一种疾病,骨髓脂肪化是 AA 主要病理表现^[1]。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 具有多向分化的潜能,可分化为脂肪细胞、成骨细胞等。实验研究证实 AA 患者 BMMSCs 易向脂肪细胞分化,且更易表达与细胞凋亡、脂肪生成和免疫反应相关的基因。增多的骨髓脂肪细胞可分泌干扰素- γ (interferon gamma, IFN- γ) 等负性调节造血因子及脂联素 (Adiponectin) 等脂肪因子,促进骨髓造血功能衰竭^[2]。

脂肪细胞的增殖与分化是多基因严密调控的复杂过程,在此过程中 CCATT 增强子结合蛋白 α (CCAAT-enhancer binding protein α , C/EBP α) 等可直接与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 启动子结合,共同调控并促进脂肪细胞的分化^[3]。而 Adiponectin 和瘦素 (Leptin) 则由脂肪细胞分泌,研究显示 AA 患者血浆 Adiponectin 水平升高,与骨髓

造血功能呈负相关^[4]。AA 患者血浆及骨髓中 Leptin 表达升高,Leptin 受体表达降低,二者结合存在失利用现象,导致 Leptin 抑制脂肪细胞分化作用减弱^[5]。

穿龙薯蓣为薯蓣科植物,别名“野山药”“穿山龙”等,性平,味苦,具有活血舒筋、消食利水、祛痰截疟等功效,其主要药理成分为穿龙薯蓣皂苷。实验研究证明穿龙薯蓣皂苷能够明显提高 AA 小鼠外周血象,减少骨髓中的脂肪细胞,促进造血细胞的恢复^[6-7]。但其如何抑制骨髓脂肪细胞分化的机制尚不明确。因此,本研究将以 AA 小鼠为研究载体,将小鼠 BMMSCs 经成脂化体系诱导后,检测与脂肪细胞分化密切相关的 PPAR γ , C/EBP α 及脂肪细胞因子,探讨 AA 小鼠 BMMSCs 脂肪化过程中穿龙薯蓣皂苷的干预作用及机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 BALB/c 小鼠 70 只,雌雄各半,6~8 周龄,体质量 (20 ± 2) g; DBA/2 小鼠 2 只,雌性,6~8 周龄,体质量 (20 ± 2) g; 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK (京)

2009-0004, 适应性喂养 1 周。实验由天津医科大学实验动物伦理委员会批准, 实验研究符合中国伦理委员会实验动物研究指导原则。

1.2 药物及试剂 穿龙薯蓣皂苷片(东胜科技股份有限公司, 批号 201502018); 环孢素片(华北制药股份有限公司, 批号 100501); 雷公藤多苷片(浙江得恩德制药有限公司, 批号 1007119); 小鼠淋巴细胞分离液(深圳索莱宝科技有限公司, 批号 p8630); 胎牛血清, RPMI 1640 培养基, DMEM 培养基(美国 Gibco 公司, 批号分别为 REF10270-106, C11875500BT, C11885500BT); FITC 标记的兔抗鼠 CD34, CD45, CD90, PE 标记的兔抗鼠 CD105, 免疫球蛋白(Ig)G(美国 BD 公司, 批号分别为 553733, 553080, 553004, 562759, 550083); 油红 O 染液(上海国药集团化学试剂有限公司, 批号 WSIG201408032); 苏木素(北京诺博莱德科技有限公司, 批号 zli-9606); trizol 总 RNA 提取试剂盒, Sybr qper mix, SuperScript III RT 反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司, 批号分别为 5596026, 4472920, 11752050); 三氯甲烷(英国 MDL 公司, 批号 MD10113); 异丙醇、无水乙醇(国药集团药业股份有限公司, 批号分别为 40064360, 10009218); 裂解液, 5% BSA 封闭液, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术公司, 批号分别为 P0013, BF06089-P-100, P0009); PVDF 膜(美国 Millipore 公司, 批号 HATF00010); 兔抗小鼠 C/EBP α , PPAR γ , Leptin, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab40764, ab23673, ab3583, ab9485); 兔抗小鼠 Adiponectin 多克隆抗体(美国 CST 公司, 批号 C45B10); 生物素标记羊抗兔 IgG(英国 MDL 公司, 批号 MD912526); ECL 显色试剂盒(武汉博士德生物公司, 批号 ab3583)。

1.3 仪器 0262 型 Coy 辐照仪(中国医学科学院血液学研究所血液病医院); ZHJH-C1109B 型超净台(江苏净化设备厂); 5427R 型低温离心机, 5424FG967792 型常温离心机(德国 Eppendorf 公司); XT-2000iv 型动物血细胞分析仪(日本希森美康公司); 311 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); D-35578 型 Wetzlar 倒置光学显微镜(德国 Leica 公司); Millipak Express40 型去离子水仪(美国 Millipore 公司); EPICS ALTRA 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); 480II 384 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士 Roche 公司); JY-ZY5 型电泳仪, 转膜仪(北京百晶生物技术

有限公司); InfiniteF50 型酶标仪(瑞士 Thermo 公司); SY-1220 型恒温水浴槽(上海珂淮仪器有限公司)。

2 方法

2.1 AA 小鼠模型的复制及评估 参照姚军^[8]方法制备 AA 小鼠模型。制备 DBA/2 小鼠淋巴细胞悬液, 将 DBA/2 小鼠断颈处死, 75% 乙醇浸泡 3 min, 无菌台取小鼠胸腺、颈部、腋窝等处淋巴结; 胸腺和淋巴结组织 1:2 混合, 加少量生理盐水, 轻轻研磨后过滤, 成单细胞悬液; 台盼蓝染色鉴定细胞活性达 95% 以上。计数并配成密度为 5×10^9 个/L 备用。建立免疫介导的再障小鼠模型, 将小鼠随机分为正常组和模型组, 模型组小鼠经⁶⁰Coy 射线均匀照射全身, 剂量为 6 Gy, 剂量率为 1 Gy \cdot min⁻¹。4 h 内尾静脉输注来自 DBA/2 小鼠淋巴细胞混悬液 1×10^6 个/只。正常组行假照射(铅砖屏蔽), 尾静脉注射同等体积的生理盐水。模型评价, 第 2 天进行模型评价, 造模成功标准为造模小鼠外周血象三系计数下降, 骨髓细胞涂片示骨髓增生情况低下。

2.2 分组与处理 模型评价成功后, 再次将成模小鼠随机分为模型组, 穿龙薯蓣皂苷低、中、高剂量组, 环孢素组, 雷公藤多苷组, 每组 10 只。灌胃给药 14 d, 每日 1 次。穿龙薯蓣皂苷低、中、高剂量组灌胃剂量分别为 37.44, 74.88, 149.76 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 环孢素组 23.5 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 雷公藤多苷组 9.36 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 正常组及模型组给予同等体积的蒸馏水。

2.3 血液采集 第 15 天, 各组小鼠通过目内眦取血 100 μ L, 血细胞分析仪检测血常规, 评估药物对造血的影响。

2.4 小鼠骨髓细胞涂片观察 治疗结束后, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 无菌条件下分离胸骨, 止血钳夹闭胸骨压出骨髓液, 瑞氏染色涂片, 显微镜下观察骨髓增生情况。

2.5 各组小鼠 BMMSCs 的分离、培养及鉴定 小鼠 BMMSCs 的分离, 无菌条件下分离各组小鼠双侧股骨, 剪断股骨两端, 用 1640 培养液反复冲洗骨髓腔, 将收集好骨髓细胞放于离心管内, 反复吹打, 制成悬液。将细胞悬液以 1:1 比例加在淋巴细胞分离液表面, 2 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 分离单个核细胞层并移入 5 mL 离心管内, 加磷酸盐缓冲液(PBS)液 2 mL, 1 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 去上清, 洗 2 次。取 1640 培养液(10% 胎牛血清, 青霉素 0.073 7 g \cdot L⁻¹, 链霉素 0.1717 g \cdot L⁻¹, 碳酸氢钠 2 g \cdot L⁻¹) 悬浮沉淀

细胞,台盼蓝染色检测细胞活性在 95% 以上。小鼠 BMMSCs 的培养,将悬液移至 25 mL 培养瓶在 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度下培养 24 h 后换液,弃未贴壁细胞,以后每 2~3 d 换液 1 次,待细胞生长至 90% 的密度用胰蛋白酶消化 2 min,加含有胎牛血清的培养基终止消化,重复以上过程至第 3 代。小鼠 BMMSCs 的鉴定,取生长良好的第 3 代 BMMSCs 胰酶消化后 PBS 冲洗,1 000 r·min⁻¹离心 3 min,细胞重悬于 PBS 100 μL 中,分装至离心管中,将细胞分为 5 组,分别加入 CD34,CD45,CD105,CD90 及同型对照各 10 μL。37 °C 避光孵育 30 min 后 PBS 冲洗,2 000 r·min⁻¹离心 10 min,弃上清,加入 PBS 1 mL 重悬细胞上流式细胞仪。镜下观察小鼠 BMMSCs 形态。

2.6 各组小鼠 BMMSCs 成脂化诱导及油红 O 染色

取生长良好的第 3 代 BMMSCs 接种至培养瓶,密度为 2 × 10⁴ 个/cm²,加入成脂诱导体系 [DMEM (L) 培养液 + 体积分数为 10% 胎牛血清 + 5 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 + 2 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 吡啶美辛 + 1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 地塞米松 + 10 mg·L⁻¹ 胰岛素]。间断诱导,每诱导 3 d 用 10 g·L⁻¹ 胰岛素维持 3 d,再换成脂诱导液诱导,共 7 d。收集细胞,4% 多聚甲醛固定 10~15 min,油红 O 由去离子水(3:2)稀释后浸染 10 min,苏木素复染 5 min,PBS 冲洗后镜下观察。

2.7 Real-time PCR 检测各组小鼠 BMMSCs PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin mRNA 表达

取各组经成脂化体系诱导的小鼠 BMMSCs,无菌 PBS 洗涤 3 次,留细胞团加入 trizol,手动混匀使细胞变性裂解,加入三氯甲烷混匀静置 2~3 min,4 °C 条件下 12 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上层水相置于新离心管,加等体积异丙醇静置 10 min,4 °C 条件下 12 000 r·min⁻¹离心 10 min。弃上清,加 80% 乙醇,4 °C 条件下 1 万 r·min⁻¹离心 10 min。室温风干沉淀,加入 DEPC 水 20 μL 溶解沉淀,计算 A₂₆₀/A₂₈₀ 值在 1.8~2.0。取 RNA 1 μg 按逆转录试剂盒说明合成 cDNA。PCR 扩增体系 20 μL,目的基因引物序列见表 1,扩增条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,56~59 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。以 β -肌动蛋白(β -actin) 作为内参,引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法对目的基因进行相对定量分析。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

名称	序列	扩增长度 /bp
C/EBP α	上游 5'-GGTTTCGGGTCGCTGGAT-3'	290
	下游 5'-CGGCTGACTCCCTCATCT-3'	
PPAR γ	上游 5'-CTGTGGGCTCACTGTTCT-3'	441
	下游 5'-AGGGCTCATCCTGTCTTT-3'	
Leptin	上游 5'-CACAGTCTGGAGCGAAGG-3	259
	下游 5'-CACAATCTGGGAACAAGC-3'	
Adiponectin	上游 5'-ATGCCTATAACCAATACC-3'	149
	下游 5'-TCAGTTCTAAGACAGCCAAT-3'	
β -actin	上游 5'-GAGGCCAGAGCAAGAGAGGT-3'	162
	下游 5'-TTCACGGTTGGCCTTAGGGTT-3'	

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组小鼠 BMMSCs PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin 蛋白表达

取各组经成脂化体系诱导的小鼠 BMMSCs 培养瓶加入胰蛋白酶消化 2 min,加入含有胎牛血清的培养基终止消化,收集细胞,加预冷的裂解液和蛋白酶抑制剂,冰上裂解 30 min,4 °C 条件下 12 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸出上清液移至新的离心管。制备 BSA 标准品,稀释至 0.5 g·L⁻¹,计算工作液总量,按照 50:1 的比例将 BCA 试剂 A 和试剂 B 混合。将样本蛋白加入 PBS 稀释 5 倍,分别将标准品和样本加入 96 孔板中,各孔加标准品稀释液补足到 20 μL,另加 BCA 工作液 200 μL,37 °C 放置 30 min,波长为 562 检测吸光度 A,根据标准曲线计算蛋白浓度。根据蛋白定量结果,将蛋白样品与 Loading buffer 4:1 混匀,95 °C 变性 10 min。样品缓缓加入凝胶孔中,SDS-PAGE 电泳(电压 8 V·cm⁻¹);转膜(65 V,2 h),用 5% BSA 封闭液封闭 1 h。加入一抗(1:3 000),4 °C 反应过夜,TBST 洗涤 3 次,将二抗用 1 × TBST 稀释 3 000 倍,将反应膜放入工作液中,孵育 2 h,TBST 洗膜,ECL 法显影,应用 Image J 软件分析,以 GAPDH 作为内参分析灰度值。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 19.0 对数据进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AA 小鼠一般状态及外周血血象的影响 与正常组比较,模型组小鼠精神萎靡、活动度降低,体质量下降,皮毛光泽度减低,死亡率高。而各治疗

组均得到不同程度缓解。与正常组比较,模型组小鼠外周血中 WBC, HGB, PLT 计数均显著下降 ($P <$

0.01)。与模型组比较,各治疗组小鼠血象均有不同程度回升 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 穿龙薯蓣皂苷对 AA 小鼠外周血血象的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

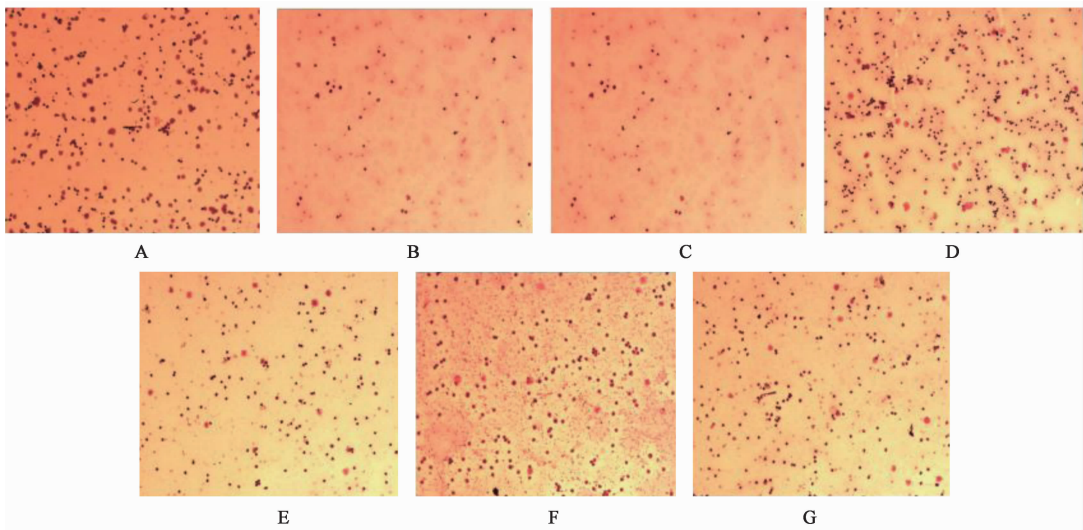
Table 2 Effect of diosgenin on peripheral blood hemogram in AA mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	WBC/($\times 10^9$)个/L ⁻¹	HGB/g·L ⁻¹	PLT/($\times 10^9$)个/L ⁻¹
正常	-	10.62 ± 1.43	170.98 ± 16.79	892.17 ± 93.16
模型	-	3.11 ± 0.94 ¹⁾	104.91 ± 21.05 ¹⁾	347.36 ± 76.84 ¹⁾
穿龙薯蓣皂苷	37.44	4.16 ± 1.09	114.38 ± 15.91	388.08 ± 59.85
	74.88	9.38 ± 1.25 ²⁾	127.25 ± 16.59 ²⁾	525.63 ± 72.65 ²⁾
	149.76	8.25 ± 0.64 ²⁾	119.67 ± 4.26	485.27 ± 82.54 ²⁾
环孢素	23.5	8.57 ± 1.23 ²⁾	121.23 ± 13.42	527.47 ± 76.90 ²⁾
雷公藤多苷	9.36	6.22 ± 0.80 ²⁾	108.27 ± 14.36	414.85 ± 47.58

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3,4 同)。

3.2 对 AA 小鼠骨髓象的影响 与正常组比较,模型组小鼠骨髓增生低下,骨髓细胞数量减少。与模型组

比较,经治疗后,各组小鼠骨髓细胞数量增多,骨髓增生活跃。穿龙薯蓣皂苷中剂量组效果更好。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 穿龙薯蓣皂苷低剂量组;D. 穿龙薯蓣皂苷中剂量组;E. 穿龙薯蓣皂苷高剂量组;F. 环孢素组;G. 雷公藤多苷组(图 5 同)

图 1 穿龙薯蓣皂苷对 AA 小鼠骨髓象的影响(瑞氏, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of diosgenin on bone marrow in AA mice(Wright's, $\times 100$)

3.3 小鼠 BMMSCs 流式细胞表型鉴定 国际间充质及组织干细胞委员会鉴定 MSCs 标准^[9]如下,标准培养下, MSCs 具备贴壁特性;通过流式检测, MSCs 表达 CD73, CD90, CD105 阳性率超过 95%,且 CD34, CD45, CD114 等阳性率 $< 5%$; MSCs 具有向成骨细胞、脂肪细胞等的分化能力。本研究结果显示:镜下可见小鼠 BMMSCs 贴壁生长,细胞扁平狭长,成梭形或纺锤型,鱼群样紧密排列。小鼠

BMMSCs CD90, CD105 表达阳性, CD34, CD45 表达阴性。见图 2,3。

3.4 小鼠 BMMSCs 诱导向成脂细胞的分化 在油红 O 染色条件下,脂肪细胞核呈蓝色,胞浆呈砖红色,提示 BMMSCs 被诱导成脂肪细胞。与正常组比较,模型组脂肪细胞数量增多。见图 4。

3.5 对 AA 小鼠 BMMSCs PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin mRNA 的表达 与正常组比较,

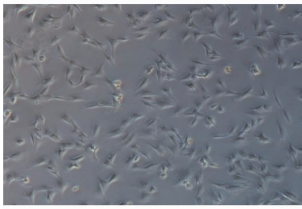


图 2 倒置相差显微镜下小鼠骨髓间充质干细胞原代培养 G3(倒置显微镜, ×200)

Fig.2 Primary culture of mouse BMMSCs under inverted phase contrast microscope G3 (inverted microscope, ×200)

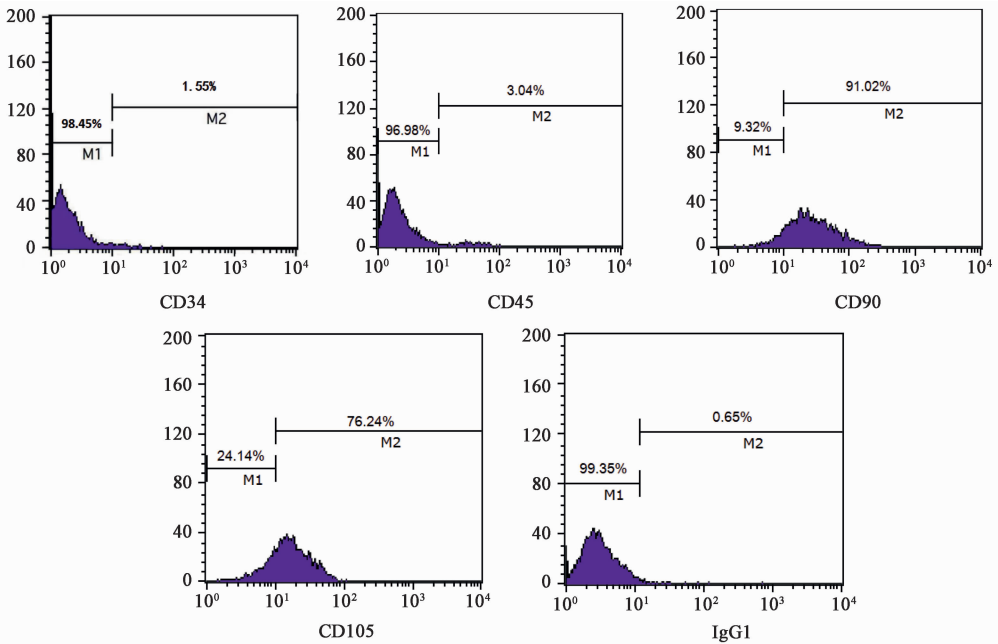


图 3 小鼠骨髓间充质干细胞表面抗原表达

Fig.3 Expression of surface marker antigen of mouse BMMSCs

表 3 穿龙薯蓣皂苷对小鼠 BMMSCs PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of diosgenin on expression of PPAR, C/EBP, Adiponectin and Leptin mRNA in BMMSCs of AA mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	PPAR γ	C/EBP α	Adiponectin	Leptin
正常	-	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.12
模型	-	5.29 ± 0.22 ¹⁾	1.71 ± 0.23 ¹⁾	2.04 ± 0.18 ¹⁾	4.81 ± 0.23 ¹⁾
穿龙薯蓣皂苷	37.44	4.37 ± 0.21 ²⁾	1.31 ± 0.20 ²⁾	1.71 ± 0.15	3.98 ± 0.29 ²⁾
	74.88	1.85 ± 0.14 ²⁾	0.81 ± 0.21 ²⁾	0.95 ± 0.19 ²⁾	1.57 ± 0.15 ²⁾
	149.76	3.62 ± 0.26 ²⁾	0.94 ± 0.17 ²⁾	0.79 ± 0.19 ²⁾	3.34 ± 0.22 ²⁾
环孢素	23.5	3.10 ± 0.20 ²⁾	0.33 ± 0.10 ²⁾	0.64 ± 0.16 ²⁾	2.48 ± 0.24 ²⁾
雷公藤多苷	9.36	4.68 ± 0.26 ²⁾	0.69 ± 0.15 ²⁾	1.19 ± 0.21 ²⁾	4.26 ± 0.22 ²⁾

组 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin 蛋白表达水平平均明显下降 ($P < 0.05$), 其中穿龙薯蓣皂苷中剂量组和西药环孢素组各蛋白表达明显下降, 优于中药雷公藤多苷组 ($P < 0.05$)。穿龙薯蓣皂苷中剂量

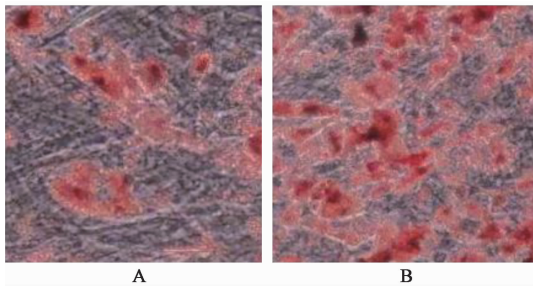
模型组 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin mRNA 表达水平均明显下降 ($P < 0.05$), 其中以穿龙薯蓣皂苷中剂量组、环孢素组下降明显, 二者下降趋势大致相同。见表 3。

3.6 对 AA 小鼠 BMMSCs PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗

组与环孢素组 PPAR γ , Leptin 表达未见明显差异。见图 5, 表 4。

4 讨论

在中医学中, AA 归于“髓劳”“髓枯”“血症”等



A. 正常组; B. 模型组

图 4 正常组及模型组小鼠骨髓间充质干细胞诱导成脂细胞分化(油红 O, ×400)

Fig. 4 Mouse bone marrow mesenchymal stem cells induced into adipocytes in model group and normal group (Oil red O, ×400)

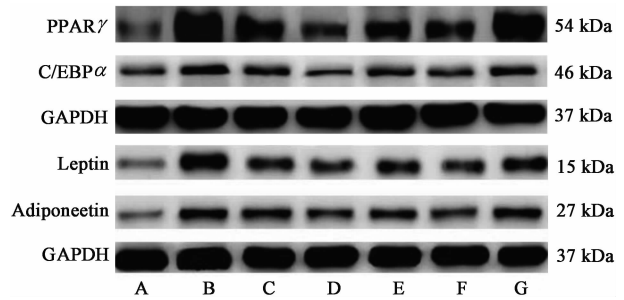


图 5 各组小鼠骨髓间充质干细胞 PPAR γ , C/EBP α , Leptin, Adiponectin 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of PPAR γ , C/EBP α , Leptin, Adiponectin protein expression in bone marrow mesenchymal stem cells of each group of mice

表 4 穿龙薯蓣皂苷对 AA 小鼠骨髓间充质干细胞 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Leptin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of diosgenin on of PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin and Leptin proteins in bone marrow mesenchymal stem cells of AA mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	PPAR γ /GAPDH	C/EBP α /GAPDH	Adiponectin/GAPDH	Leptin/GAPDH
正常	-	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.32	1.00 ± 0.32
模型	-	2.95 ± 0.32 ¹⁾	3.47 ± 0.32 ¹⁾	6.14 ± 0.52 ¹⁾	7.12 ± 0.52 ¹⁾
穿龙薯蓣皂苷	37.44	2.32 ± 0.27 ²⁾	2.69 ± 0.27 ²⁾	5.57 ± 0.30	2.96 ± 0.30 ²⁾
	74.88	1.21 ± 0.28 ²⁾	1.74 ± 0.30 ²⁾	2.98 ± 0.40 ²⁾	2.33 ± 0.40 ²⁾
	149.76	1.47 ± 0.24 ²⁾	1.88 ± 0.10 ²⁾	3.58 ± 0.35 ²⁾	4.47 ± 0.35 ²⁾
环孢素	23.5	1.17 ± 0.20 ²⁾	1.14 ± 0.20 ²⁾	1.79 ± 0.32 ²⁾	2.83 ± 0.32 ²⁾
雷公藤多苷	9.36	2.05 ± 0.25 ²⁾	2.26 ± 0.30 ²⁾	5.15 ± 0.43 ²⁾	4.84 ± 0.43 ²⁾

范畴,其病位在骨髓,根本在肾,本病缠绵,久病则酿生痰浊瘀滞^[10]。现代研究认为,骨髓微环境的改变和 BMMSCs 成脂化是本病重要机制之一。现代研究发现穿龙薯蓣具有抗炎^[11]、抗癌^[12]、调节血脂^[13]、调节免疫^[6]、促进成骨细胞的增殖和分化^[14]等作用。

前期实验已经证实其主要有效成分穿龙薯蓣皂苷可调节再障免疫功能紊乱,对再障具有较好的治疗作用^[15]。本研究通过免疫介导法复制 AA 小鼠模型,结果显示造模小鼠外周血三系计数下降,骨髓细胞涂片示骨髓增生情况低下,提示造模成功。经穿龙薯蓣皂苷治疗后,AA 小鼠外周血三系不同程度升高,并且骨髓细胞数量增多,其中以穿龙薯蓣皂苷中剂量组效果较佳。

BMMSCs 是一种多能分化干细胞,是骨髓微环境的重要组成部分,与细胞外基质、细胞因子等形成复杂的相互作用,除对造血细胞起支架作用外,还对造血细胞的增殖、迁移等发挥重要作用。BMMSCs

被认为是脂肪前体细胞和成骨细胞的共同前体细胞,二者在骨髓微环境中发挥着相反的调节作用,在一定条件下可以相互转化^[16]。目前研究普遍认为,再障患者的 BMMSCs 成骨、成脂之间的分化失衡,并且 AA 患者的 BMMSCs 更易诱导分化为脂肪细胞^[17-18],骨髓中脂肪细胞的增多对造血细胞具有负调控作用^[19]。本实验通过流式细胞术鉴定分离培养的第 3 代细胞,其高表达干细胞标志 CD90, CD105,同时低表达造血前体细胞标志 CD34,白细胞表面标志 CD45,证明所分离的细胞具有典型干细胞标志而有别于骨髓来源的其他细胞,并符合鉴定标准^[9]。经鉴定后的各组小鼠 BMMSCs 进行成脂化诱导,通过成脂相关 mRNA 及蛋白的检测判断 BMMSCs 的成脂分化能力。

BMMSCs 成脂化过程受多条信号通路的调控,但最终都主要表现在对 PPAR γ 的调控。PPAR γ 是 PPAR 家族中最具脂肪细胞专一性且成脂能力较强的成员,它与配体结合后形成异二聚体,通过靶基因

启动子上下游的过氧化物增殖体反应元件结合发挥转录调控作用^[20]。若抑制 PPAR γ 的表达,则成脂分化过程也会被抑制^[21]。再障中 BMMSCs 成脂分化能力的增强与其高表达 PPAR γ 密切相关,免疫组化显示 AA 小鼠 PPAR γ 表达的阳性细胞率明显增加^[22]。在成脂化过程中,PPAR γ 与 C/EBP α 结合后,可启动分化程序使脂肪前体细胞分化为脂肪细胞^[23]。本研究中分离培养 AA 及各治疗组小鼠 BMMSCs 进行成脂化诱导后,发现模型组 PPAR γ , C/EBP α mRNA 和蛋白表达水平异常升高。可见,PPAR γ 介导的脂肪形成信号参与 AA 的发病过程。上调的 PPAR γ , C/EBP α 可促进脂肪细胞的分化,这可能是 AA 患者 BMMSCs 过度成脂化的机制之一。本实验结果显示,穿龙薯蓣皂苷连续治疗 2 周后可使异常升高的 PPAR γ , C/EBP α mRNA 和蛋白表达显著下降,表明穿龙薯蓣皂苷可能通过影响 PPAR γ , C/EBP 表达而抑制 BMMSCs 向脂肪细胞分化。

Adiponectin 和 Leptin 是 PPAR γ 通路调控下由脂肪细胞分泌的主要因子,对脂肪细胞代谢具有重要的调节作用。PPAR γ 激活后可结合在 Adiponectin 基因的启动子位置对 Adiponectin 产生正调控作用,应用 PPAR γ 特异拮抗剂可降低 Adiponectin mRNA 表达水平^[24]。在体外诱导 BMMSCs 成脂后可在培养上清液中检测出高表达的 Adiponectin^[25]。Adiponectin 和 Leptin 在促进 AA 患者 BMMSCs 脂肪化过程中发挥重要作用。Tripathy 等^[26]研究发现 AA 患者与正常人相比,BMMSCs 诱导分化的脂滴密度更高、脂肪细胞更大,Adiponectin 表达水平更高。王晓燕等^[4]研究发现 AA 患者 Adiponectin 表达水平升高,且与骨髓造血功能呈负相关。AA 患者骨髓过度脂肪化导致 Adiponectin 分泌增加,升高的 Adiponectin 通过抑制骨髓造血干细胞增殖、分化,进而加重骨髓造血功能的衰竭。本研究中模型组小鼠 BMMSCs Adiponectin 表达水平明显升高,与相关研究结果一致^[4]。

Leptin 在造血、炎症,特别是免疫调节中发挥重要的生物学效应。研究显示 Leptin 参与调控 T 细胞分化及细胞因子的分泌,其可增加 IFN- γ 和白细胞介素-2 的分泌,减少白细胞介素-4 的分泌,影响骨髓中淋巴细胞的发育成熟并可抑制 T, B 细胞的凋亡,同时可激活 T 淋巴细胞向 Th1, Th17 细胞分化^[27-28],对 T 细胞外周效应细胞功能起着重要作用。另一方面, Laharrague 等^[29]发现 Leptin 可在骨

髓脂肪细胞分化中高度表达。最近研究也显示 Leptin 可通过与 BMMSCs 表面的 Leptin 受体结合,激活 JAK2/STAT3 通路,促进 BMMSCs 脂肪细胞的形成、抑制成骨细胞的形成^[30]。本研究中模型组小鼠 BMMSCs Leptin 表达水平明显升高,说明 Leptin 分泌异常可能成为导致 AA 小鼠 BMMSCs 功能异常的重要原因之一。经穿龙薯蓣皂苷药物灌胃治疗后,小鼠 Adiponectin 和 Leptin 表达水平较模型组显著降低,这表明穿龙薯蓣皂苷可抑制 Leptin, Adiponectin 在 AA 小鼠 BMMSCs 的表达水平,抑制 AA 小鼠 BMMSCs 脂肪化进程。

综上所述, PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin 和 Leptin 参与了 AA 骨髓造血功能衰竭的过程。穿龙薯蓣皂苷能抑制 PPAR γ , C/EBP α mRNA 及蛋白表达,降低脂肪细胞分泌的 Adiponectin 和 Leptin 水平,达到缓解和抑制 BMMSCs 脂肪化的作用,有效改善骨髓造血,对 AA 具有积极的治疗作用。

[参考文献]

- [1] Yamazaki H. Acquired aplastic anemia [J]. Rinsho Ketsueki, 2016, 57(2): 91-97.
- [2] LI J, YANG S, LU S, et al. Differential gene expression profile associated with the abnormality of bone marrow mesenchymal stem cells in aplastic anemia [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e47764.
- [3] Clarke S L, Robinson C E, Gimble J M. CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 promoter [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 240(1): 99-103.
- [4] 王晓燕, 余卫, 罗英. 再生障碍性贫血患者血浆脂联素水平与骨髓造血功能相关性研究 [J]. 新医学, 2012, 43(3): 181-183.
- [5] 刘国文, 刘玉山, 刘晓丹, 等. AA 病人血浆和骨髓瘦素及其受体表达与意义 [J]. 青岛大学医学院学报, 2014, 50(6): 493-495.
- [6] WANG Y, YANT, MA L, et al. Effects of the total saponins from *Dioscorea nipponica* on immunoregulation in aplastic anemia mice [J]. Am J Chin Med, 2015, 43(2): 289-303.
- [7] 刘宝山, 马霖, 苗润静, 等. 穿龙薯蓣皂苷调节再生障碍性贫血免疫共刺激分子的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(12): 4441-4443.
- [8] 姚军. 淋巴细胞与再生障碍性贫血关系的实验研究 [J]. 中华血液学杂志, 1991, 12(5): 229-231.
- [9] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal

- criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8 (4): 315-317.
- [10] 韦润红,陈艳丽,刘现辉. 补髓生血汤对慢性再生障碍性贫血患者骨髓基质细胞相关细胞因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 23(6):192-197.
- [11] YU H, ZHENG L, YIN L, et al. Protective effects of the total saponins from *Dioscorea nipponica* Makino against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of apoptosis and inflammation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19(2):233-244.
- [12] LIU Y, LI H, FAN Y, et al. Antioxidant and antitumor activities of the extracts from chinese yam (*Dioscorea oppositifolia* thunb.) flesh and peel and the effective compound[J]. *J Food Sci*, 2016, 81(6):1553-1564.
- [13] WANG T, Choi R C, LI J, et al. Trillin, a steroidal saponin isolated from the rhizomes of *Dioscorea nipponica*, exerts protective effects against hyperlipidemia and oxidative stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 139(1):214-220.
- [14] ZHANG C, PENG J, WU S, et al. Dioscin promotes osteoblastic proliferation and differentiation via Lrp5 and ER pathway in mouse and human osteoblast-like cell lines[J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21(1):30.
- [15] 刘宝山,纪超伦,杨向东,等. 穿龙薯蓣皂苷抑制再生障碍性贫血 p-mTOR/p-S6 的机制研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(12):1637-1641.
- [16] CHEN Q, SHOU P, ZHENG C, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(7):1128-1139.
- [17] ZHANG J, ZHU X. Defectiveness of bone marrow mesenchymal stem cells in acquired aplastic anemia [J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2015, 1(17):100-106.
- [18] LI J, YANG S, LU S, et al. Differential gene expression profile associated with the abnormality of bone marrow mesenchymal stem cells in aplastic anemia [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e47764.
- [19] Sugimura R, LI L. Shifting in balance between osteogenesis and adipogenesis substantially influences hematopoiesis[J]. *J Mol Cell Biol*, 2010, 2(2):61-62.
- [20] Ferré P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity[J]. *Diabetes*, 2004, 53(1):43-50.
- [21] Bionaz M, Monaco E, Wheeler M B. Transcription adaptation during *in vitro* adipogenesis and osteogenesis of porcine mesenchymal stem cells: dynamics of pathways, biological processes, up-stream regulators, and gene networks [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e137644.
- [22] 徐海玲. PPAR γ 在免疫介导的再生障碍性贫血小鼠骨髓中的表达及意义 [D]. 太原:山西医科大学, 2014.
- [23] Madsen M S, Siersbaek R, Boergesen M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor and C/EBP synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading [J]. *Mol Cell Biol* 2014, 34(6): 939-954.
- [24] 涂珺,罗新新,李冰涛,等. 小檗碱对脂肪胰岛素抵抗细胞 PPAR γ 及脂肪分泌因子表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(11):1983-1989.
- [25] Martella E, Bellotti C, Dozza B, et al. Secreted adiponectin as a marker to evaluate *in vitro* the adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(11):1476-1485.
- [26] Tripathy N K, Singh S P, Nityanand S. Enhanced adipogenicity of bone marrow mesenchymal stem cells in aplastic anemia [J]. *Stem Cells International*, 2014, 2014:1-6.
- [27] Fernández-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, et al. Role of leptin in the activation of immune cells [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010:568348.
- [28] Reis B S, Lee K, Fanok M H, et al. Leptin receptor signaling in T cells is required for Th17 differentiation [J]. *J Immunol*, 2015, 194(11):5253-5260.
- [29] Laharrague P, Larrouy D, Fontanilles A M, et al. High expression of Leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture [J]. *FASEB J*, 1998, 12(9): 747-753.
- [30] YUE R, ZHOU B O, Shimada I S, et al. Leptin receptor promotes adipogenesis and reduces osteogenesis by regulating mesenchymal stromal cells in adult bone marrow[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6):782-796.

[责任编辑 周冰冰]