

犀角地黄汤通过线粒体途径抑制免疫性骨髓衰竭血小板凋亡的实验研究

夏乐敏 崔乐乐 姜一陵 张爱萍 罗梅宏

(上海市宝山区中西医结合医院血液科,上海 201900)

摘要 目的:探讨犀角地黄汤对免疫性骨髓衰竭小鼠模型线粒体途径血小板凋亡的调控作用。方法:将 60 只 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别为正常对照组、模型对照组、环孢素(CSA)对照组和犀角地黄汤低、中、高剂量组。除正常对照组以外,其余各组小鼠建立免疫性骨髓衰竭模型。造模当天开始,正常对照组和模型对照组予生理盐水灌胃,CSA 对照组予 CSA 灌胃,犀角地黄汤各剂量组分别予犀角地黄汤低、中、高剂量灌胃。治疗后各组小鼠用自动血细胞分析仪检测血常规,采用流式细胞仪测定线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)、细胞色素 C(Cyt C)、磷脂酰丝氨酸(PS)、钙离子(Ca^{2+}),采用蛋白印迹(Western blot)法检测 Bax、Bak、半胱天冬酶(Caspase)-3、Caspase-8、Caspase-9 的表达,透射电镜下观察骨髓巨核细胞、血小板超微结构的变化。结果:与模型对照组比较,CSA 对照组、犀角地黄汤各剂量组小鼠血小板计数明显升高 ($P<0.01$),CSA 对照组、犀角地黄汤各剂量组 $\Delta\Psi_m$ 、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 明显升高 ($P<0.01$),CSA 对照组、犀角地黄汤各剂量组 Cyt C、PS、 Ca^{2+} 、Bax、Bak 明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。电镜下 CSA 对照组、犀角地黄汤各剂量组巨核细胞、血小板结构损伤均较模型对照组有所减轻。结论:犀角地黄汤治疗急性骨髓衰竭血小板减少的机制可能通过线粒体途径抑制血小板凋亡,且治疗效果与剂量有一定相关性。

关键词 犀角地黄汤 骨髓衰竭 血小板凋亡 病理学 实验研究

中图分类号 R289.51

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2017)04-0074-04

骨髓衰竭性疾病是一组以造血功能不良为主的疾病,免疫介导的造血干细胞损伤在骨髓衰竭性疾病发病中占有重要地位^[1]。免疫性骨髓衰竭导致血小板减少引起的出血是临床上十分棘手的问题。中医凉血止血法是治疗急性出血的有效方法,临床研究发现,凉血止血代表方犀角地黄汤能改善骨髓衰竭血小板减少引起的出血情况,而其相关机制则不甚明确^[2]。环孢素(CSA)治疗血小板减少的机制之一一是抑制线粒体途径介导血小板凋亡,从而增加血小板的生存时间^[3]。本研究拟通过动物实验,探索犀角地黄汤可否通过线粒体途径抑制免疫性骨髓衰竭血小板凋亡起到止血的作用。

1 实验材料

1.1 动物 C57BL/6 小鼠,雌雄各半,8~12 周龄,体重(20±2)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供。饲养于室温(22±2)℃,湿度 55%左右,12h 明暗交替环境中,自由饮食与进水。动物许可证号:SCXK(沪)2012-0002。

1.2 药品 犀角地黄汤生药材按《中国药典》(2015 年版)一次性从上海宝山区中西医结合医院药房选

购,犀角以水牛角代替。全方由水牛角 30g、生地黄 24g、赤芍 12g、丹皮 9g 组成,取 2 剂,共 150g。将全方药材粉碎成粗粉,用 8 倍水浸泡 1h,先煎水牛角 1h 后加入其他药材文火煎煮 20min,煎煮 2 次,合并滤液,调整 pH 值至中性,浓缩定容至 100mL,其原液质量浓度为 7.5g/mL,4℃保存。

CSA 胶囊:诺华德国制药有限公司,批号:S0408,25mg×50 粒/盒。用无菌生理盐水配置成 4mg/mL 的溶液。

1.3 试剂 TMRE、FITC 标记的 annexin V、fluo-3 单抗、细胞色素 C(Cyt C)单抗购自美国 Medsystem 公司;抗半胱天冬酶(caspase)-8、caspase-9、caspase-3 单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.4 主要仪器 JJ224BC 型电子天平(美国双杰公司);CYTOMICS FC 500 流式细胞分析仪(美国 Beckman Coulter 公司);Sysmex XE-2100 血球仪(日本希森美康公司);FRESCO 17 离心机(美国 Thermo 公司);Model 680 酶标仪(美国 Bio-Rad 公

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研课题(201640144);宝山区卫生青年医学人才培养计划(bswsyq-2016-A11);上海市宝山区中西医结合医院国家自然科学基金培育专项项目(GZRPYJJ-201601);上海市宝山区中西医结合医院科研项目(201601)

司);移液器(德国 Eppendorf 公司);Mini Protean 3 Cell 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);PS-9 电转仪(中国大连竞迈科技有限公司);磁力搅拌器(中国太仓华美生化仪器厂);脱色摇床(中国麒麟贝尔仪器厂);JEM-1230 透射电子显微镜(日本 Jeol 公司)。

2 实验方法

2.1 分组与造模 将 60 只 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组,分别为正常对照组、模型对照组、CSA 对照组和犀角地黄汤低、中、高剂量组,每组 10 只。除正常对照组以外,其余各组小鼠复制免疫性骨髓衰竭模型。参照赵忻等^[4]介绍的造模方法,取 DBA/2 小鼠断颈处死,用 75%乙醇浸泡 5min,常规消毒后取出胸腺,加少量生理盐水洗去血迹,轻轻磨碎后用尼龙滤血网过滤,通过 4 号针头使成单细胞悬液,台盼蓝鉴定细胞活性(活性细胞达 95%以上),细胞计数后配成所需浓度备用。将实验小鼠以 5.5Gy(照射剂量率 110cGy/min)的 60Co-γ 射线全身照射后,于 4h 内经尾静脉输入 DBA/2 小鼠的胸腺淋巴细胞混悬液 1×10⁶/只。造模后 3d,小鼠尾静脉血常规计数显示全血细胞减少,提示此法造模成功。

2.2 给药 根据《药理实验方法学》,正常人每日常规用药量 1.07g/kg,按照体表面积换算后,犀角地黄汤低、中、高剂量组小鼠每日给药剂量分别为 4.875、9.75、19.5g/kg,CSA 对照组每日给药剂量为 0.027g/kg。每只小鼠按 0.1mL/10g 体重灌胃,正常对照组和模型对照组灌胃等量生理盐水。各组均于造模当天起开始给药,每日灌胃 1 次,连续给药 3d。

2.3 标本采集 各组小鼠于实验第 3 天腹腔注射 10%水合氯醛 0.005mL/g 进行麻醉,经尾静脉丛采血,待做血常规并制备洗涤血小板。取小鼠下肢胫骨,用 2.5%戊二醛前固定,1%锇酸后固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂包埋,将样本制备超薄切片,采用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,透射电镜分析。

2.4 洗涤血小板制备 取小鼠静脉血 0.7mL 与 ACD(2.5%柠檬酸钠,2.0%葡萄糖,1.5%柠檬酸)按 1:7 抗凝,1300r/min 离心 20min 得到富含血小板的血浆 (PRP),将 PRP 以 2500r/min 离心 20min,弃上清,用 CGS 缓冲液 (0.123mol/L 氯化钠,0.033mol/L 葡萄糖,0.013mol/L 柠檬酸钠,pH6.5) 悬浮并离心,洗涤沉淀的血小板,再用修改的 Tyrode's 缓冲液 (2.5mmol/L Hepes,150mmol/L 氯化钠,2.5mmol/L 氯化钾,1mmol/L 氯化钙,1mmol/L 氯化

镁,12mmol/L 碳酸氢钠,5.5mmol/L 葡萄糖,pH7.4) 重悬血小板,得到洗涤血小板悬液,用计数板对血小板进行计数,调整血小板悬液至浓度为 3×10⁸ 个/mL,室温静置 60min。

2.5 指标观察 每日称量小鼠的体重,观察小鼠的皮毛变化、出血和死亡情况等。自动血细胞分析仪检测血常规。采用流式细胞仪测定线粒体膜电位 (Δψ_m)、Cyt C、磷脂酰丝氨酸 (PS)、钙离子 (Ca²⁺),采用 Western-blot 法检测 Bax、Bak、caspase-3、caspase-8、caspase-9 的表达。流式细胞仪与蛋白印迹 (Western blotting) 法检测参照操作手册。Western-blot 法测定以 β-actin 蛋白为内参,BandScan 软件分析条带的光密度值,计算各组蛋白的相对表达量 (目的蛋白/内参蛋白)。透射电镜下观察骨髓巨核细胞、血小板超微结构的变化。

2.6 统计学方法 所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件包进行分析,数据以 (x̄±s) 表示,多组间计量资料采用方差分析,有统计学差异后进一步两两比较采用 SNK 法,显著性标准 P<0.05。

3 实验结果

3.1 各组小鼠皮毛变化、出血和死亡情况 正常对照组小鼠皮毛无异常,全身无明显出血点。模型对照组全身有散在出血点。CSA 对照组、犀角地黄汤各剂量组全身出血情况优于模型对照组。实验期间,各组均无动物死亡。

3.2 各组小鼠治疗后血小板计数比较 结果见表 1。

表 1 各组小鼠治疗后血小板计数比较

组别	动物数(只)	PLT(×10 ⁹ /L)
正常对照组	10	614.20±53.90
模型对照组	10	352.40±53.56**
CSA 对照组	10	580.30±88.86 ^{##}
犀角地黄汤低剂量组	10	452.00±38.36 ^{###▲▲}
犀角地黄汤中剂量组	10	520.00±122.27 ^{##}
犀角地黄汤高剂量组	10	547.50±70.84 ^{##■}

注:与正常对照组比较,**P<0.01;与模型对照组比较,##P<0.01;与 CSA 对照组比较,▲▲P<0.01;与犀角地黄汤低剂量组比较,■P<0.01。

表 2 各组小鼠治疗后 Δψ_m、Cyt C、PS、Ca²⁺比较

组别	动物数(只)	Δψ _m	Cyt C	PS	Ca ²⁺
正常对照组	10	0.84±0.07	0.19±0.01	0.04±0.01	65.13±3.79
模型对照组	10	0.20±0.02 ^{**}	0.89±0.04 ^{**}	0.73±0.11 ^{**}	340.02±25.64 ^{**}
CSA 对照组	10	0.60±0.07 ^{##}	0.33±0.05 ^{##}	0.55±0.08 ^{##}	96.49±5.95 ^{##}
犀角地黄汤低剂量组	10	0.45±0.10 ^{###▲▲}	0.62±0.07 ^{###▲▲}	0.57±0.14 ^{##}	191.40±31.21 ^{###▲▲}
犀角地黄汤中剂量组	10	0.46±0.10 ^{###▲▲}	0.39±0.01 ^{###▲▲■}	0.50±0.10 ^{##}	180.90±4.34 ^{###▲▲}
犀角地黄汤高剂量组	10	0.33±0.03 ^{###▲▲▼▼}	0.51±0.08 ^{###▲▲▼▼}	0.49±0.20 ^{##}	252.45±6.25 ^{###▲▲▼▼}

注:与正常对照组比较,**P<0.01;与模型对照组比较,##P<0.05,###P<0.01;与 CSA 对照组比较,▲▲P<0.01;与犀角地黄汤低剂量组比较,■P<0.01;与犀角地黄汤中剂量组比较,▼▼P<0.01。

3.3 各组小鼠治疗后 $\Delta\psi_m$ 、Cyt C、PS、 Ca^{2+} 比较 结果见表 2。

3.4 各组小鼠 Bax、Bak、caspase-3、caspase-8、caspase-9 表达比较 结果见图 1、表 3。

3.5 各组小鼠治疗后骨髓巨核细胞、血小板超微结构比较 电镜下观察到正常对照组巨核细胞可见细胞膜、细胞质和细胞核,核分叶,胞核规则且大小均等,染色质呈块状凝集,细胞器结构完整,胞浆内有偶见空泡,胞质内有大量血小板颗粒聚集,少量核糖体及内质网。模型对照组巨核细胞细胞膜、细胞核膜缺损,胞核固缩不规则,染色质呈块状凝集,部分核固缩,细胞器结构破坏,线粒体肿胀可见线粒体嵴损伤,胞浆内有大量空泡,胞质内血小板重度减少,血小板外膜固缩,不规整,胞浆呈空洞,大泡状。CSA 对照组、犀角地黄汤各剂量组巨核细胞、血小板结构也有不同程度损伤,但均较模型对照组有所减轻。见图 2。

4 讨论

血小板减少而引起的严重出血在临床上十分凶险,通常的西医治疗方法是输注血小板、大剂量丙种球蛋白或糖皮质激素冲击。然而,血小板输注受血源匮乏限制,丙种球蛋白价格昂贵,大剂量激素副作用较大,都使得这些治疗措施受到局限。而对于骨髓衰竭治疗所使用的方法难以短时间起效,如抗胸腺球蛋白(ATG)、抗淋巴细胞球蛋白(ALG)和免疫抑制剂 CSA 等。因此,探寻新的、有效的止血方法尤为重要。

骨髓衰竭导致血小板减少所引起的出血表现,可归属于中医学“血证”范畴,急性出血如衄血、咯血、呕血等,常突然发生,血色鲜红,伴有舌红、脉数等症状,

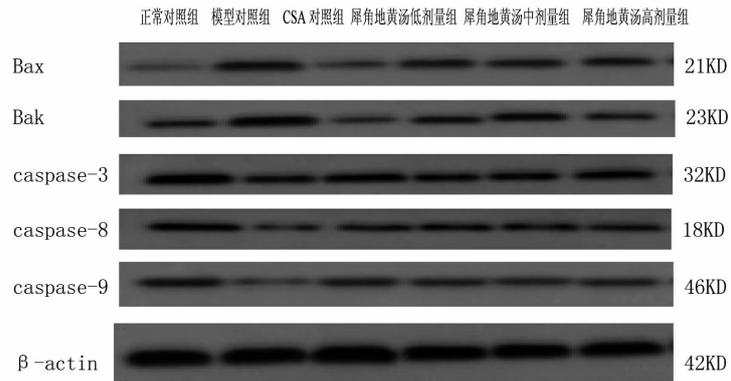


图 1 各组小鼠 Bax、Bak、caspase-3、caspase-8、caspase-9 表达

表 3 各组小鼠治疗后 Bax、Bak、caspase-3、caspase-8、caspase-9 表达比较

组别	动物数 (只)	Bax Area/b-actin	Bak Area/b-actin	caspase-3 Area/b-actin	caspase-8 Area/b-actin	caspase-9 Area/b-actin
正常对照组	10	0.14±0.01	0.21±0.02	0.63±0.03	0.63±0.03	0.64±0.03
模型对照组	10	0.52±0.04**	0.49±0.04**	0.24±0.03**	0.24±0.02**	0.23±0.03**
CSA 对照组	10	0.20±0.03**	0.23±0.02**	0.48±0.02**	0.47±0.04**	0.47±0.04**
犀角地黄汤低剂量组	10	0.29±0.05***▲	0.36±0.02***▲	0.46±0.03**	0.42±0.06**▲	0.41±0.04***▲
犀角地黄汤中剂量组	10	0.33±0.04***▲▲	0.37±0.04***▲	0.40±0.06***▲▲	0.42±0.04***▲	0.40±0.04***▲
犀角地黄汤高剂量组	10	0.40±0.03***▲▲▲▼	0.35±0.04***▲	0.39±0.06***▲▲	0.40±0.07***▲	0.40±0.04***▲

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型对照组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$;与 CSA 对照组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与犀角地黄汤低剂量组比较,■ $P<0.05$,■▲ $P<0.01$;与犀角地黄汤中剂量组比较,▼▼ $P<0.01$ 。

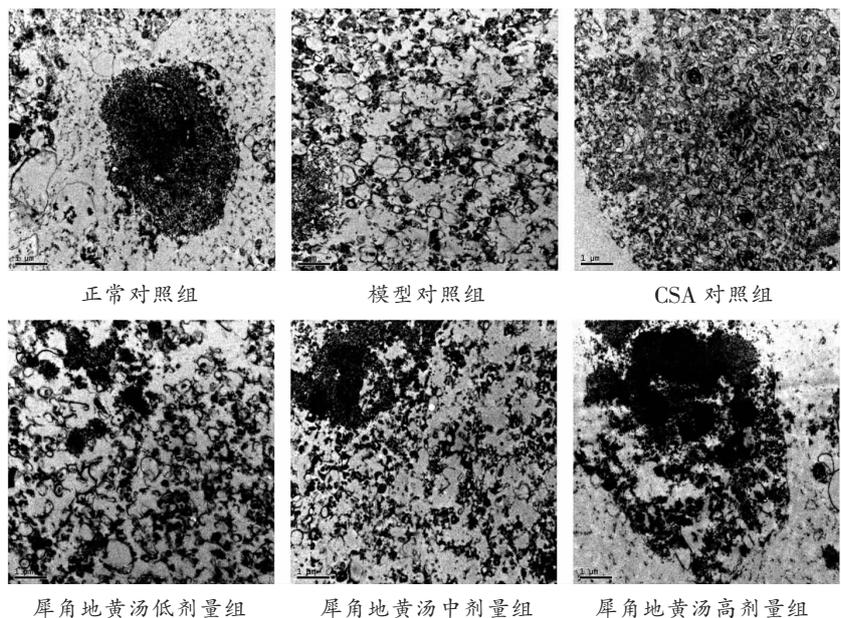


图 2 各组小鼠巨核细胞、血小板超微结构比较($\times 10000$)

与中医血热妄行证相合。正如《济生方·吐衄》所云:“夫血之妄行也,未有不因热之所发,盖血得热则淖溢。”根据中医病机结合临床实践,凉血止血法是急性出血主要治法^[5]。数据统计亦显示,临床上凉血止血法在“血证”治疗中运用最多,占一半以上^[6]。犀角地黄汤出自《备急千金要方》,为凉血止血法代表方之一,

用于急性出血血热妄行证疗效良好。方用苦咸寒之犀角(临床上多用水牛角代替)为君,凉血清心而解热毒,使火平热降,毒解血宁;臣以甘苦寒之生地,凉血滋阴生津,助犀角清热凉血,又能止血,亦可复已失之阴血;用苦微寒之赤芍与辛苦微寒之丹皮共为佐药,清热凉血、活血散瘀,可收化斑之功。四药相配,共成凉血止血之剂。该方所治疗的血症多表现为发生突然,血色鲜红,亦符合骨髓衰竭急性出血的临床表现。著名血液学家黄振翘认为,急性骨髓衰竭早期以邪盛标实为突出,外感温热邪毒,实火充斥,症见鼻衄、齿衄等出血表现,治用解毒散邪、凉血止血以尽早、尽快控制症状,选方多用犀角地黄汤加减^[7]。

近年来发现,没有细胞核的血小板也会出现凋亡,通常由内始式和外始式两条途径介导^[8],其中内始式途径(即线粒体途径)在血小板凋亡中起主要调控作用。研究显示,免疫性骨髓衰竭小鼠模型会出现外周血中血小板等血细胞减少以及 caspase-8、caspase-3 蛋白浓度降低等共同途径凋亡标志物的变化,提示该病血小板减少的发病机制与细胞凋亡密切相关^[9-10]。也就是说,免疫性骨髓衰竭血小板减少不仅和骨髓造血抑制有关,还与血小板过度凋亡有密切关系。线粒体介导的血小板凋亡主要过程是: $\Delta\psi_m$ 下降,这是凋亡的早期表现及特征性改变;同时,线粒体膜通透性转换孔(MPTP)形成,而后有多种线粒体蛋白转移至胞质发挥调控血小板凋亡的作用;接着,促凋亡蛋白活化并易位至线粒体,线粒体膜间隙释放 Cyto C 至胞质;随后,血小板内 caspase-8、caspase-9、caspase-3 蛋白依次活化,裂解细胞骨架,血小板膜表面 PS 外翻表达,血小板皱缩及血小板微粒脱落,最终血小板发生凋亡^[11]。

鉴于犀角地黄汤多用于急性出血的治疗,故本研究采用短期干预的方法。结果显示,犀角地黄汤与 CSA 均可显著提高免疫性骨髓衰竭小鼠血小板计数,抑制线粒体跨膜电位下降,减少促凋亡蛋白 Bax、Bak 易位至线粒体,减少血小板凋亡,同时抑制线粒体膜间隙 Cyt C 释放至胞质,抑制 caspase-8、caspase-9、caspase-3 蛋白酶原级联活化,避免细胞骨架裂解。实验结果也显示犀角地黄汤可减少 PS 外翻,降低 Ca^{2+} 表达。犀角地黄汤不同剂量组之间,血小板计数随犀角地黄汤剂量的升高依次升高,提示犀角地黄汤治疗血小板减少与剂量有一定相关性,而线粒体途径凋亡指标并未完全呈现剂量相关性,提示犀角地黄汤提高血小板的作用可能还涉及其他机制。电镜下模型对照组巨核细胞、血小板结

构损伤明显,而 CSA 对照组、犀角地黄汤各剂量组巨核细胞、血小板结构损伤较轻。巨核细胞是血小板生成的前体细胞,说明 CSA 和犀角地黄汤不仅对血小板凋亡有抑制作用,可能对巨核细胞凋亡也有影响。

综上,骨髓衰竭血小板减少与线粒体途径密切相关,犀角地黄汤治疗急性骨髓衰竭血小板减少的机制之一可能与 CSA 类似,即通过线粒体途径抑制血小板凋亡,且治疗效果与剂量有一定相关性。下一步的研究将围绕其他动物模型及骨髓衰竭患者的随机临床实验,以验证犀角地黄汤在血小板线粒体途径有效作用靶点。

参考文献

- [1] 齐薇薇,邵宗鸿.免疫性骨髓衰竭症[J].中华医学杂志,2015,95(15):1189.
 - [2] 华芳卉.复方黄黛片联合加味犀角地黄汤治疗热毒阴虚型重再障的临床研究[D].南京:南京中医药大学,2015.
 - [3] LEYTIN V, ALLEN D J, MUTLU A, et al. Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore [J]. Lab Invest, 2009, 89(4): 374.
 - [4] 赵忻,汪明春,廖继东,等.免疫介导小鼠再障模型方法的改进[J].中国病理生理杂志,2002,18(6):716.
 - [5] 樊亚巍.清热凉血法治疗血证的临床及机理研究进展[J].中医文献杂志,1998,16(1):40.
 - [6] 杨丽娟.凉血散瘀类方剂的整理研究[D].南京:南京中医药大学,2009.
 - [7] 许毅.黄振翘治疗急性再生障碍性贫血经验[J].中医杂志,2006,47(9):655.
 - [8] WINKLER J, RAND M L, SCHMUGGE M, et al. Omi/HtrA2 and XIAP are components of platelet apoptosis signalling[J]. Thromb Haemost, 2013, 109(3): 532.
 - [9] SATYAMITRA M, NEY P, GRAVES J 3rd, et al. Mechanism of radioprotection by δ -tocotrienol: pharmacokinetics, pharmacodynamics and modulation of signalling pathways [J]. Br J Radiol, 2012, 85(1019): e1093.
 - [10] CHEN J, DESIERTO M J, FENG X, et al. Immune-mediated bone marrow failure in C57BL/6 mice [J]. Exp Hematol, 2015, 43(4): 256.
 - [11] LEYTIN V. Apoptosis in the anucleate platelet [J]. Blood Rev, 2012, 26(2): 51.
- 第一作者:夏乐敏(1981—),男,医学博士,主治医师,研究方向为中西医结合诊治血液疾病。
通讯作者:罗梅宏,博士,主任医师,硕士研究生导师。lmh021009@163.com

收稿日期:2016-12-25

编辑:吴宁