

## 补肾益精健脾养血方对贫血大鼠骨髓细胞凋亡的影响

王正引<sup>1</sup>, 陈燕<sup>1</sup>, 刘蔚雯<sup>1</sup>, 郭明章<sup>2</sup>, 张小如<sup>1</sup>

(1. 福建中医药大学药学院, 福建福州 350122; 2. 福建中医药大学中医学院, 福建福州 350122)

**摘要:**【目的】观察补肾益精健脾养血方对贫血大鼠骨髓细胞凋亡的影响。【方法】将48只Wistar大鼠随机分为空白组, 模型组, 中药低、中、高剂量组, 肌苷组(阳性对照), 每组8只。模型组及各给药组以腹腔注射环磷酰胺法建立贫血模型, 空白组给予等容积生理盐水腹腔注射。成功造模后, 中药低、中、高剂量组给予补肾益精健脾养血方6、12、24 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃, 肌苷组给予肌苷0.05 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃, 空白组和模型组则给予等容积的生理盐水灌胃, 给药2周。全自动血液分析仪检测外周血红细胞数、白细胞数、血小板数及血红蛋白含量。末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)法测定骨髓细胞凋亡百分率, 光镜下观察骨髓细胞凋亡情况。蛋白免疫印迹法检测骨髓细胞B-细胞淋巴瘤/白血病-2原癌基因(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspase)3、Caspase 8的表达。【结果】与空白组比较, 模型组血红细胞数、白细胞数、血小板数、血红蛋白含量及骨髓细胞Bcl-2蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ ), 光镜下骨髓凋亡细胞增多, 骨髓细胞凋亡百分率及骨髓细胞Bax、Caspase 3、Caspase 8蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ )。经补肾益精健脾养血方干预后, 上述指标得到明显改善。【结论】补肾益精健脾养血方抗贫血作用机制可能与其减少骨髓细胞凋亡有关。

**关键词:** 补肾益精健脾养血方; 贫血; 骨髓细胞; 细胞凋亡; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)05-0997-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.05.025

## Effects of Kidney-Nourishing, Marrow-Replenishing, Spleen-Invigorating, Blood-Nourishing Decoction on Marrow Cells Apoptosis in Rats with Anemia

WANG Zheng-Yin<sup>1</sup>, CHEN Yan<sup>1</sup>, LIU Wei-Wen<sup>1</sup>,  
GUO Ming-Zhang<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-Ru<sup>1</sup>

(1. Pharmacy School, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122 Fujian, China; 2. Chinese Medicine School, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122 Fujian, China)

**Abstract: Objective** To observe the effects of Kidney-Nourishing, Marrow-Replenishing, Spleen-Invigorating, Blood-Nourishing Decoction on marrow cells apoptosis in rats with anemia. **Methods** A total of 48 Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, low-, middle-, high-dose Chinese medicine groups and carnine group (positive control), 8 rats in each group. An anemia model was established in the model group and various medication groups by intraperitoneal injection of cyclophosphamide, and the blank group was given intraperitoneal injection of the same volume of normal saline. After successful modeling, the low-, middle- and high-dose Chinese medicine groups were given intragastric administration of Kidney-Nourishing, Marrow-Replenishing, Spleen-Invigorating, Blood-Nourishing Decoction at the dosage of 6, 12, 24 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respectively, the carnine group was given intragastric administration of carnine at the dosage of 0.05 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, and the blank group and model group were given intragastric administration of the same volume of normal saline, the treatment lasting 2 weeks. After medication, the peripheral hemogram was tested by full-automatic blood analyzer, the percent of marrow cells apoptosis was measured by TUNEL assay, and features of marrow cells apoptosis were observed under optical microscope, and the protein expression levels of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X Protein (Bax), cysteinyl aspartate-specific protease (Caspase) 3 and

收稿日期: 2020-11-11

作者简介: 王正引(1978-), 男, 医学博士, 副教授; E-mail: johnzwang@163.com

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(编号: 2017J01834)

Caspase 8 in marrow cells were detected by Western blotting assay. **Results** Compared with the blank group, the counts of erythrocytes, leukocytes, platelets and content of hemoglobin as well as protein expression level of Bcl-2 in marrow cells were decreased in the model group ( $P < 0.05$ ), more marrow apoptotic cells were seen under optical microscope, and the percent of marrow cells apoptosis and protein expression levels of Bax, Caspase 3 and Caspase 8 were increased ( $P < 0.05$ ). After intervention of Kidney-Nourishing, Marrow-Replenishing, Spleen-Invigorating, Blood-Nourishing Decoction, the above indexes were obviously improved. **Conclusion** The mechanism of Kidney-Nourishing, Marrow-Replenishing, Spleen-Invigorating, Blood-Nourishing Decoction for anti-anemia is possible to be associated with reduction of marrow cells apoptosis.

**Keywords:** Kidney-Nourishing, Marrow-Replenishing, Spleen-Invigorating, Blood-Nourishing Decoction; anemia; marrow cells; cell apoptosis; rats

贫血是临床上常见的一种因外周血红细胞容量减少, 血液携氧能力下降而导致循环、神经、消化等多系统症状的综合征, 以血红蛋白浓度低于正常范围下限为临床诊断依据。贫血可原发于造血系统或是继发于系统性疾病, 原发性病因如骨髓造血功能衰竭、造血细胞凋亡亢进、造血原料不足或利用障碍等, 继发性病因如肾功能不全、感染、肿瘤等<sup>[1-2]</sup>。中医学对贫血的辨证论治, 认为其证属血虚。而血虚的成因, 既有先天禀赋不足, 又有后天调摄失当。肾中所藏先天之精可化髓为血。《景岳全书·血症》曰: “血即精之属也, 但精藏于肾, 所蕴不多, 而血富于冲, 所至皆是。”脾为后天之本, 气血生化之源。《读医随笔》曰: “夫血者, 水谷之精微, 得命门真火蒸化。”可见脾的运化是精血化生的基础, 而肾中精气可化生元气, 促进脾胃运化水谷精微, 化为营血。故肾精亏虚、脾失健运是造成血虚的主要原因之一。补肾益精健脾养血方源自于本校张小如教授研发的康欣口服液(国药准字B20020032), 全方由制首乌、黄芪、枸杞子、黄精、女贞子、当归组成, 该方以补肾健脾为主, 益精髓补中气以资化源, 达到养血补血的目的。为从分子水平进一步探讨该方抗贫血的作用机制, 本研究通过观察补肾益精健脾养血方对贫血大鼠骨髓细胞凋亡及凋亡调控分子B-细胞淋巴瘤/白血病-2原癌基因(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax), 凋亡执行分子半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspase) 3、Caspase 8表达的影响, 以期为临床应用补肾益精健脾养血方治疗贫血提供依据。现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 **实验动物** 48只清洁级6月龄Wistar大鼠, 雌雄各半, 体质量( $200 \pm 20$ )g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 动物质量合格证号: SCXK(沪)2012-0002。大鼠常规饲养于福建省中医药研究院动物实验室, 温度( $21 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 $55\% \pm 5\%$ 。

1.2 **实验药物** 补肾益精健脾养血方组成: 制首乌12g、黄芪12g、枸杞子10g、黄精10g、女贞子10g、当归10g。中药饮片购自福州中正医药连锁有限公司。将饮片用水浸泡30min, 煎煮2次, 取2次水煎液合并后过滤、浓缩至每mL药液含生药量2.4g, 置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。成人日给药总量合计为64g, 根据等效剂量折算系数<sup>[3]</sup>计算大鼠日给药剂量为 $6\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 按1:2:4比例计算低、中、高剂量给药分别为6、12、24 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

1.3 **主要试剂与仪器** 注射用环磷酰胺(德国Baxter Oncology GmbH公司, 批号: 6K148A); 肌苷片(北京中新药业股份有限公司, 批号: 161103); Bax、Bcl-2、Caspase 3、Caspase 8抗体(英国Abcam公司); 总蛋白提取试剂盒(上海纯优生物科技有限公司); 电化学发光(ECL)试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); 末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)细胞凋亡原位检测试剂盒(瑞士Roche公司); 聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司)。XT2000iv全自动血液分析仪(日本Sysmex公司); Centrifuge 5415D低温离心机(德国Eppendorf公司); GDS-8000凝胶成像系统(美国UVP公司)。

1.4 **动物分组、造模与给药** 将48只Wistar大鼠

随机分为6组,分别为空白组,模型组,中药低、中、高剂量组,肌苷组(阳性对照),每组8只。大鼠适应性饲养1周后,参照化学损伤法<sup>[4]</sup>复制贫血模型。方法:模型组、各给药组于实验第1天给予大鼠腹腔注射环磷酰胺,隔日1次,共4次,剂量分别为0.06、0.06、0.03、0.03 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;空白组给予等容积生理盐水腹腔注射。造模同期,即于实验第1天开始中药低、中、高剂量组给予大鼠补肾益精健脾养血方6、12、24 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,肌苷组给予肌苷0.05 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,空白组和模型组则给予等容积的生理盐水灌胃,每日1次,给药2周。

### 1.5 观察指标与方法

1.5.1 外周血象检测 给药结束后,即于实验第15天,从大鼠眼眶后静脉丛采血,用全自动血液分析仪检测外周血红细胞数、白细胞数、血小板数及血红蛋白含量。通过各组外周血象比较,判断模型是否建立成功<sup>[5-6]</sup>以及方药是否有抗贫血的作用。

1.5.2 骨髓细胞采集 采血后,颈椎脱臼处死大鼠,以38 g·L<sup>-1</sup>枸橼酸钠及磷酸盐缓冲液(PBS)按1:9配制骨髓冲液。取大鼠股骨,暴露两端骨髓,用带有5号针头的1 mL注射器吸取骨髓冲液反复冲洗得骨髓悬液。用PBS冲洗2~3次,然后以12 000 r/min离心15 min收集细胞,于-80℃保存,以备用于蛋白免疫印迹(Western Blot)检测。

1.5.3 骨髓细胞凋亡检测 取制备的骨髓悬液制作细胞涂片,以40 g·L<sup>-1</sup>多聚甲醛固定30 min,应用TUNEL试剂盒进行染色。每张TUNEL切片在光镜下连续观察5个阳性细胞最多的高倍视野,以每个视野100个细胞计数。细胞核呈现出棕黄色或者棕褐色染色的细胞为阳性细胞,细胞核蓝染的细胞是苏木素复染的阴性细胞。计算阳性细胞数与

总细胞数的百分比,即凋亡百分率。

1.5.4 Western Blot法检测骨髓细胞Bax、Bcl-2、Caspase 3、Caspase 8蛋白表达 取骨髓细胞样本,用总蛋白提取试剂盒提取蛋白。总蛋白上样电泳后,在电转液中65 V电压,2 h转膜,将蛋白从分离胶转至PVDF膜,置于封闭液中,室温封闭1 h。将Bax、Bcl-2、Caspase 3、Caspase 8等一抗按1:1 000稀释,将封闭后的膜放入一抗工作液中,于4℃反应过夜。洗膜3次,每次10 min。再将二抗按1:3 000稀释,将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液中,室温孵育1 h。洗膜3次,每次10 min。按电化学发光法曝光、洗片,应用凝胶成像分析仪对胶片进行扫描,检测条带灰度值,进行Bax、Bcl-2、Caspase 3、Caspase 8半定量分析。计算目的蛋白条带灰度值与内参β-actin条带灰度值的比值,表示目的蛋白的相对表达含量。

1.6 统计方法 采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。对于正态分布且方差齐同的数据采用单因素方差分析和最小显著差异LSD-*t*检验。非正态分布或方差不齐的数据采用Nemenyi法<sup>[7]</sup>进行非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠外周血象比较 表1结果显示:与空白组比较,模型组红细胞数、白细胞数、血小板数及血红蛋白含量均显著降低( $P < 0.05$ ),表明贫血模型建立。与模型组比较,中药低剂量组和肌苷组红细胞数、白细胞数、血小板数及血红蛋白含量均明显升高( $P < 0.05$ )。中药中剂量组和高剂量组红细胞数、白细胞数、血小板数及血红蛋白含量均升高,其中白细胞数及血小板数显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。表明补肾益精

表1 各组大鼠外周血象比较

Table 1 Comparison of the peripheral hemogram in rats of various groups

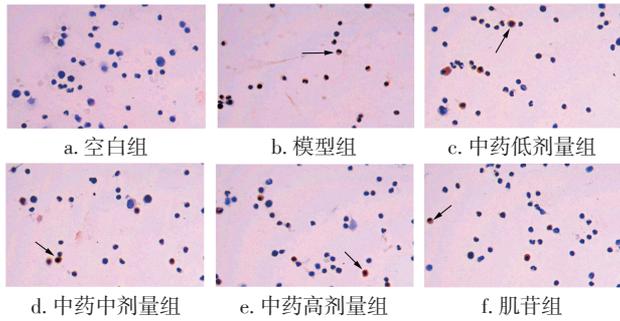
( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	红细胞数(10 <sup>12</sup> ·L <sup>-1</sup> )	白细胞数(10 <sup>9</sup> ·L <sup>-1</sup> )	血小板数(10 <sup>9</sup> ·L <sup>-1</sup> )	血红蛋白含量(g·L <sup>-1</sup> )
空白组	8	7.71 ± 0.58	9.01 ± 1.34	934.88 ± 72.21	146.88 ± 8.15
模型组	8	2.63 ± 1.59 <sup>①</sup>	3.75 ± 1.81 <sup>①</sup>	669.75 ± 246.77 <sup>①</sup>	60.88 ± 30.55 <sup>①</sup>
中药低剂量组	8	5.98 ± 0.32 <sup>②</sup>	6.52 ± 1.49 <sup>②</sup>	955.38 ± 245.14 <sup>②</sup>	122.63 ± 3.85 <sup>②</sup>
中药中剂量组	8	5.00 ± 0.33	8.37 ± 1.61 <sup>②</sup>	1 219.63 ± 178.08 <sup>②</sup>	104.75 ± 6.88
中药高剂量组	8	5.56 ± 0.27	9.72 ± 1.31 <sup>②</sup>	1 078.38 ± 129.48 <sup>②</sup>	109.38 ± 5.24
肌苷组	8	6.04 ± 0.17 <sup>②</sup>	12.96 ± 1.31 <sup>②</sup>	956.38 ± 252.66 <sup>②</sup>	119.25 ± 6.18 <sup>②</sup>

① $P < 0.05$ ,与空白组比较;② $P < 0.05$ ,与模型组比较

健脾养血方具有抗贫血作用。

2.2 各组大鼠骨髓细胞凋亡情况比较 图1结果显示:与空白组比较,模型组阳性细胞即凋亡细胞明显增多,细胞固缩,细胞核致密深染呈棕黄色或棕褐色,苏木素复染后,细胞核呈蓝色的阴性细胞即正常骨髓细胞明显减少。与模型组比较,中药各剂量组及肌苷组凋亡细胞减少,正常骨髓细胞增多。



注:黑色箭头指示凋亡细胞,细胞核呈棕黄色或棕褐色

图1 各组大鼠骨髓细胞凋亡病理特征比较 (TUNEL法,×400)

Figure 1 Comparison of the pathological features of marrow cells apoptosis in rats of various groups (by TUNEL, ×400)

表2结果显示:与空白组比较,模型组骨髓细胞凋亡百分率显著升高(P<0.05);与模型组比较,中药各剂量组及肌苷组骨髓细胞凋亡百分率均降低,其中,中药中、高剂量组和肌苷组差异有统计学意义(P<0.05)。

2.3 各组大鼠骨髓细胞 Bax、Bcl-2、Caspase 3、Caspase 8 蛋白表达水平比较 图2、表3结果显示:与空白组比较,模型组骨髓细胞 Bax、

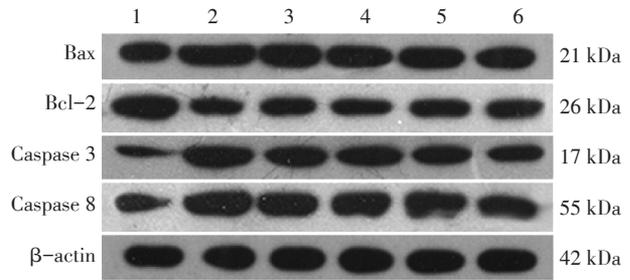
表2 各组大鼠骨髓细胞凋亡百分率比较

Table 2 Comparison of the percents of marrow cells apoptosis in rats of various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	骨髓细胞凋亡百分率(%)
空白组	8	2.00 ± 0.76
模型组	8	66.36 ± 5.37 <sup>①</sup>
中药低剂量组	8	35.13 ± 4.32
中药中剂量组	8	21.63 ± 3.58 <sup>②</sup>
中药高剂量组	8	19.13 ± 10.33 <sup>②</sup>
肌苷组	8	16.38 ± 1.92 <sup>②</sup>

①P<0.05,与空白组比较;②P<0.05,与模型组比较

Caspase 3、Caspase 8 相对蛋白含量显著升高, Bcl-2 相对蛋白含量显著降低,差异均有统计学意义(P<0.05)。与模型组比较,中药各剂量组及肌苷组 Bax、Caspase 3 及 Caspase 8 相对蛋白含量显著降低, Bcl-2 相对蛋白含量显著升高,差异均有统计学意义(P<0.05)。



1. 空白组; 2. 模型组; 3. 中药低剂量组; 4. 中药中剂量组; 5. 中药高剂量组; 6. 肌苷组

图2 各组大鼠骨髓细胞 Bax、Bcl-2、Caspase 3、Caspase 8 的 Western Blot 电泳条带

Figure 2 Western blotting strips of Bax, Bcl-2, Caspase 3 and Caspase 8 in marrow cells from rats of various groups

表3 各组大鼠骨髓细胞 Bax、Bcl-2、Caspase 3、Caspase 8 蛋白表达水平比较

Table 3 Comparison of the protein expression levels of Bax, Bcl-2, Caspase 3 and Caspase 8 in rat marrow cells of various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	Bax 相对表达量	Bcl-2 相对表达量	Caspase 3 相对表达量	Caspase 8 相对表达量
空白组	8	0.27 ± 0.11	1.41 ± 0.19	0.24 ± 0.04	0.46 ± 0.14
模型组	8	1.12 ± 0.16 <sup>①</sup>	0.45 ± 0.15 <sup>①</sup>	1.14 ± 0.21 <sup>①</sup>	1.35 ± 0.27 <sup>①</sup>
中药低剂量组	8	0.86 ± 0.22 <sup>②</sup>	0.70 ± 0.19 <sup>②</sup>	0.87 ± 0.14 <sup>②</sup>	0.99 ± 0.18 <sup>②</sup>
中药中剂量组	8	0.81 ± 0.20 <sup>②</sup>	0.84 ± 0.22 <sup>②</sup>	0.83 ± 0.11 <sup>②</sup>	0.89 ± 0.28 <sup>②</sup>
中药高剂量组	8	0.75 ± 0.22 <sup>②</sup>	0.94 ± 0.22 <sup>②</sup>	0.69 ± 0.12 <sup>②</sup>	0.78 ± 0.21 <sup>②</sup>
肌苷组	8	0.62 ± 0.22 <sup>②</sup>	1.01 ± 0.25 <sup>②</sup>	0.48 ± 0.14 <sup>②</sup>	0.65 ± 0.17 <sup>②</sup>

①P<0.05,与空白组比较;②P<0.05,与模型组比较

### 3 讨论

骨髓造血功能下降是造成贫血的重要发病机制。骨髓单个核细胞是广义的造血细胞,有研究表明,造血干细胞数量减少与骨髓细胞凋亡增加有关<sup>[8]</sup>。再生障碍性贫血患者骨髓单个核细胞凋亡增加,通过阻止细胞周期和死亡相关因子(Fas)信号通路促进CD34<sup>+</sup>细胞的凋亡,并能抑制凋亡抑制基因B-细胞淋巴瘤/白血病-长x蛋白(Bcl-xL)在红细胞谱系的表达<sup>[9-10]</sup>。由于凋亡基因的启动激活,或基质细胞造血存活因子获得性缺陷,或毒物的直接作用及介导免疫反应对骨髓造成损伤<sup>[11]</sup>,从而破坏骨髓造血微环境,导致贫血。

Bcl-2家族在细胞凋亡信号传导的线粒体通路中起调节作用, Bax是Bcl-2家族中一个重要的促凋亡因子,可通过改变线粒体膜的渗透性,使细胞色素C由线粒体释放到胞浆,进一步激活下游的Caspase,导致细胞凋亡。Bcl-2可与Bax形成异构二聚体,阻止细胞色素c、第二线粒体来源胱氨酸酶激活剂(Smac)释放,进而抑制细胞凋亡<sup>[12-13]</sup>。Caspase 3与Caspase 8既是细胞凋亡信号传导的共同通路,又是导致细胞凋亡关键的启动和执行分子。Caspase 3激活后,可催化裂解二磷酸腺苷核糖多聚酶,抑制DNA修复,并促使核酸内切酶的活化,裂解细胞关键结构蛋白,破坏细胞的正常形态。Caspase 8激活后,可进一步诱导线粒体释放细胞色素C,放大凋亡信号,加速细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>。

中医学认为肾藏精,肾主骨生髓,肾中精气可化生元气,促进脾胃运化水谷精微,而血的生成源于脾所运化产生的水谷精微以及肾所藏之精髓。因此,从补肾健脾的角度进行抗贫血机制研究,符合中医辨证论治的特点。补肾益精健脾养血方以制首乌、黄芪为君药,制首乌性味甘温,归肝、肾经,功可补益精血,益肾固精,常用于血虚所致的头晕目眩、心悸失眠、面色萎黄、体倦乏力等症,黄芪甘而微温,归脾、肺经,可健脾益气而生血,用于气虚血亏。枸杞子、黄精为臣药,枸杞子甘平,归肝、肾经,可补肝肾,益精血,黄精味甘性平,归脾、肺、肾经,可滋肾填精,健脾益气,以补养阴血。女贞子、当归为佐药,女贞子味甘苦性凉,入肝、肾经,可补肝肾之阴,益精养血,当归甘辛而温,归肝、心、脾经,既补血,又活血,《景岳全书》谓其为“血

中之气药”,使补血而不滞血。诸药相合,补肾益精健脾益气,从而养血补血。

本研究结果表明,补肾益精健脾养血方可升高贫血大鼠外周血红细胞数、白细胞数、血小板数及血红蛋白含量,改善贫血大鼠的外周血象,降低贫血大鼠骨髓细胞凋亡百分率,下调促凋亡分子Bax、Caspase 3与Caspase 8蛋白表达,上调抗凋亡分子Bcl-2蛋白表达。提示本方抗贫血作用机制可能是通过减少骨髓细胞凋亡,从而改善骨髓造血微环境,以治疗贫血。

本研究基于中医脾肾的藏象理论,从骨髓细胞凋亡的角度,探讨补肾益精健脾养血方补血作用机制,进一步夯实补血方药多元化研究基础。但初步的实验结果尚存在一些不足之处。经补肾益精健脾养血方各剂量组结果比较,对于红细胞数、血红蛋白含量的影响,低剂量组优于中、高剂量组;对于白细胞数、血小板数、骨髓细胞凋亡百分率、Bax、Bcl-2、Caspase 3与Caspase 8蛋白表达的影响,中、高剂量组优于低剂量组,组间比较虽有一定差异,但无统计学意义。表明各剂量组未能体现明显的量效相关性,因此在今后的研究中应设计更为合理的给药剂量。而鉴于细胞凋亡信号传导受多靶点调节,在下一阶段工作中,将围绕补肾益精健脾养血方对细胞色素c、Smac、Bcl-xL、Fas等其他关键调控因子的影响进行研究。

### 参考文献:

- [1] 葛均波,徐永健,王辰.内科学[M].9版.北京:人民卫生出版社,2018:536-538.
- [2] 李振娥,戚琳.贫血的非血液学病因及其发病机制[J].济宁医学院学报,2001,24(2):79-80.
- [3] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:1698.
- [4] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:1169.
- [5] 黄飞鸿,朱林杰,李迪迪,等.生血宁片对环磷酰胺致贫血小鼠的作用及机制[J].中成药,2016,38(6):1205-1210.
- [6] 黄小平,李菲,陈凌波,等.黄芪和当归配伍对环磷酰胺所致骨髓造血功能抑制小鼠造血功能的影响[J].中草药,2017,48(1):121-128.
- [7] 刘伟,林汉生.SPSS在完全随机设计多个样本间多重比较Nemenyi秩和检验中的应用[J].中国卫生统计,2009,26(2):214,216.
- [8] PHILPOTT N J, SCOPES J, MARSH J C, et al. Increased

- apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance [J]. *Exp Hematol*, 1995, 23(14): 1642-1648.
- [9] KAKAGIANNI T, GIANNAKOULAS N C, THANOPOULOU E, et al. A probable role for trail- induced apoptosis in the pathogenesis of marrow failure. Implications from an in vitro model and from marrow of aplastic anemia patients [J]. *Leuk Res*, 2006, 30(6): 713-721.
- [10] MIZUTANI T, TSUJI K, EBIHARA Y, et al. Homeostatic erythropoiesis by the transcription factor IRF2 through attenuation of type I interferon signaling [J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(3): 255-264.
- [11] 任翠爱, 张茂宏, 徐从高, 等. 环孢菌素A治疗对再生障碍性贫血患者骨髓细胞凋亡的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2001, 22(4): 189-192.
- [12] LIU F T, GOFF L K, HAO J H, et al. Increase in the ratio of mitochondrial Bax/Bcl-XL induces Bax activation in human leukemic K562 cell line[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(3): 377-384.
- [13] LOSSI L, COCITO C, ALASIA S, et al. *Ex vivo* imaging of active caspase 3 by a FRET-based molecular probe demonstrates the cellular dynamics and localization of the protease in cerebellar granule cells and its regulation by the apoptosis-inhibiting protein survivin [J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11(1): 34-54.
- [14] OLIVER L, LECABELLEC M T, PRADAL G, et al. Constitutive presence of cytochrome c in the cytosol of a chemoresistant leukemic cell line[J]. *Apoptosis*, 2005, 10(2): 277-287.
- [15] JAKUBOWSKA K, GUZIŃSKA-USTYMOWICZ K, FAMULSKI W, et al. Reduced expression of caspase-8 and cleaved caspase-3 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(3): 1879-1884.

【责任编辑：侯丽颖】

## 双氢青蒿素对Ⅱ型胶原诱导的类风湿关节炎大鼠的 抗炎和软骨修复作用

张俊<sup>1</sup>, 袁映红<sup>1</sup>, 冯志蔚<sup>1</sup>, 肖涛<sup>1</sup>, 孔亮<sup>1</sup>, 蒋科<sup>2</sup>

(1.南充市中心医院嘉陵分院骨科, 四川南充 637500; 2.川北医学院附属医院骨科, 四川南充 637000)

**摘要:**【目的】探讨双氢青蒿素对Ⅱ型胶原诱导的类风湿关节炎(RA)大鼠的抗炎作用和软骨修复作用。【方法】将75只健康6周龄雄性SD大鼠随机分为假手术组, 模型组, 双氢青蒿素低、中、高剂量组, 每组15只。除假手术组外, 其他各组大鼠均给予Ⅱ型胶原诱导构建RA模型。成功造模后, 双氢青蒿素低、中、高剂量组大鼠分别对应给予双氢青蒿素6.25、12.5、25 mg/kg灌胃处理, 1次/d, 连续给药2周。给药结束后, 检测骨指标(骨体积分数、骨表面积/骨体积、骨小梁厚度、骨小梁数量); 采用苏木素-伊红(HE)染色法观察踝关节组织病理学表现、阿利新蓝染色法观察踝关节软骨组织蛋白多糖的表达, 采用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色法观察踝关节骨组织破骨细胞情况; 采用酶联免疫吸附分析(ELISA)检测外周血中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-10、IL-17、IL-23的含量; 采用蛋白免疫印迹法检测踝关节组织成骨标记

收稿日期: 2020-06-24

作者简介: 张俊(1979-), 男, 硕士, 主治医师; E-mail: Zhangjunsophia114@163.com

通讯作者: 蒋科, 硕士, 副主任医师; E-mail: jiangke2010@ymail.com

基金项目: 四川省南充市科技项目(编号: 18SXHZ0536)