

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research西罗莫司联合环孢素 A 对再生障碍性贫血
小鼠的影响

Effects of rapamycin combined with cyclosporin A on mice with aplastic anemia

林丽屏^{1a}, 陈登云^{1b}, 庄燕玲^{1a},
王明泉^{1a}(1. 福建省泉州市第一医院, a. 输血科; b. 检验
科, 福建 泉州 362000)LIN Li - ping^{1a}, CHEN Deng - yun^{1b},
ZHUANG Yan - ling^{1a},
WANG Ming - quan^{1a}(1. a. Department of Blood Transfusion;
b. Department of Laboratory, Quanzhou
First Hospital, Quanzhou 362000, Fujian
Province, China)作者简介: 林丽屏(1984 -), 女, 主管技师, 主要
从事输血技术与治疗, 血液疾病方面
的研究

通信作者: 王明泉, 主任技师

Tel: (0595) 22277127

E - mail: 108515059@qq.com

摘要:目的 探究西罗莫司(RAP)联合环孢素 A(CsA)通过调控 T 盒转录因子(T-bet)/干扰素- γ (IFN- γ)信号通路对再生障碍性贫血小鼠造血功能及骨髓内皮生长因子(VEGF)、血小板生成素(TPO)和血管细胞黏附因子-1(VCAM-1)水平的影响。方法 将纯系雌性昆明小鼠随机分为对照组(不做任何处理)、模型组(皮下注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 环磷酰胺, 隔天 1 次, 共 4 次; 同时吸入 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲苯, 每天 1 次, 连续 8 d)、CsA 组(在模型组基础上腹腔注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CsA)、RAP-L 联合 CsA 组(在模型组基础上腹腔注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CsA 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RAP)、RAP-M 联合 CsA 组(在模型组基础上腹腔注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CsA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RAP)、RAP-H 联合 CsA 组(在模型组基础上腹腔注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CsA 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RAP)、RAP-H 组(在模型组基础上腹腔注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RAP), 每组各 10 只, 除对照组外, 其余各组均建立再生障碍性贫血模型。用生化分析仪检测外周血红细胞(RBC)、白细胞、血红蛋白和血小板水平, 用苏木精-伊红染色观察骨髓形态并进行病理损伤评分, 用酶联免疫吸附试验法检测骨髓上清液中 VEGF、VCAM-1、TPO、IFN- γ 和肿瘤坏死因子- α 水平, 用免疫组化法检测 TPO 表达水平, 用实时荧光定量聚合酶链反应和蛋白质印迹法检测骨髓单个核细胞 T-bet 的信使核糖核酸(mRNA)和蛋白表达水平。结果 对照组、模型组、CsA 组、RAP-H 联合 CsA 组和 RAP-H 组的 RBC 水平分别为 $(8.48 \pm 0.89) \times 10^{12}$ 、 $(2.14 \pm 0.25) \times 10^{12}$ 、 $(3.54 \pm 0.54) \times 10^{12}$ 、 $(6.12 \pm 0.74) \times 10^{12}$ 、 $(3.26 \pm 0.61) \times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$, 病理损伤评分分别为 (0.20 ± 0.04) 、 (2.50 ± 0.25) 、 (1.10 ± 0.10) 、 (1.00 ± 0.11) 和 (1.20 ± 0.16) 分, TPO 水平分别为 (195.48 ± 28.15) 、 (145.81 ± 15.24) 、 (169.76 ± 20.26) 、 (190.54 ± 22.37) 和 $(165.52 \pm 20.29) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, VCAM-1 水平分别为 (213.46 ± 32.33) 、 (132.81 ± 21.94) 、 (185.49 ± 19.65) 、 (204.19 ± 19.82) 和 $(183.67 \pm 20.87) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, IFN- γ 水平分别为 (132.04 ± 18.10) 、 (232.46 ± 25.29) 、 (205.98 ± 21.26) 、 (183.67 ± 20.20) 和 $(209.05 \pm 19.82) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, T-bet mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.10 、 3.98 ± 0.69 、 2.18 ± 0.21 、 1.95 ± 0.20 和 2.24 ± 0.23 , T-bet 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.10 、 2.46 ± 0.29 、 1.98 ± 0.21 、 1.67 ± 0.20 和 2.01 ± 0.22 。模型组的上述指标与对照组比较, CsA 组、RAP-H 联合 CsA 组、RAP-H 组的上述指标与模型组比较, RAP-H 联合 CsA 组的上述指标与 CsA 组和 RAP-H 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 CsA 联合 RAP 可以明显改善再生障碍性贫血模型小鼠的造血功能及细胞免疫功能, 可能与提高骨髓 TPO 和 VCAM-1 水平, 调节 T-bet/IFN- γ 信号通路有关。

关键词: 环孢素 A; 西罗莫司; 再生障碍性贫血; 造血功能; T 盒转录因子; 干扰素- γ

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.09.012

中图分类号: R979.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)09-1268-07

Abstract: Objective To explore the effects of rapamycin (RAP)

combined with cyclosporine A (CsA) on the hematopoietic function and the levels of bone marrow vascular endothelial growth factor (VEGF), thrombopoietin (TPO), and vascular cell adhesion molecule - 1 (VCAM - 1) in aplastic anemia mice by regulating the T - box transcription factor (T - bet)/interferon - gamma (IFN - γ) signaling pathway.

Methods Female Kunming mice of pure line were randomly divided into control group (without any treatment), model group (subcutaneously injected with $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ cyclophosphamide, once every other day for a total of 4 times; meanwhile, inhaling $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ toluene once a day for 8 consecutive days), CsA group (intraperitoneally injected with $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CsA on the basis of the model group), RAP - L combined with CsA group (intraperitoneally injected with $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CsA and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RAP on the basis of the model group), RAP - M combined with CsA group (intraperitoneally injected with $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CsA and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RAP on the basis of the model group), RAP - H combined with CsA group (intraperitoneally injected with $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CsA and $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RAP on the basis of the model group), and RAP - H group (intraperitoneally injected with $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RAP on the basis of the model group), with 10 mice in each group. Except for the control group, the aplastic anemia model was established in the other groups. A biochemical analyzer was used to detect the levels of peripheral blood red blood cells (RBC), white blood cells, hemoglobin and platelets. Hematoxylin - eosin staining was used to observe the bone marrow morphology and conduct pathological injury scoring. The enzyme - linked immunosorbent assay method was used to detect the levels of VEGF, VCAM - 1, TPO, IFN - γ and tumor necrosis factor - α in the bone marrow supernatant. Immunohistochemistry was used to detect the expression of TPO. Real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction and Western blotting were used to detect the messenger ribonucleic acid (mRNA) and protein expressions of T - bet in bone marrow mononuclear cells. **Results** The RBC levels of the control group, model group, CsA group, RAP - H combined with CsA group and RAP - H group were $(8.48 \pm 0.89) \times 10^{12}$, $(2.14 \pm 0.25) \times 10^{12}$, $(3.54 \pm 0.54) \times 10^{12}$, $(6.12 \pm 0.74) \times 10^{12}$ and $(3.26 \pm 0.61) \times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the pathological injury scores were (0.20 ± 0.04) , (2.50 ± 0.25) , (1.10 ± 0.10) , (1.00 ± 0.11) and (1.20 ± 0.16) points, respectively; the TPO levels were (195.48 ± 28.15) , (145.81 ± 15.24) , (169.76 ± 20.26) , (190.54 ± 22.37) and $(165.52 \pm 20.29) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the VCAM - 1 levels were (213.46 ± 32.33) , (132.81 ± 21.94) , (185.49 ± 19.65) , (204.19 ± 19.82) and $(183.67 \pm 20.87) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the IFN - γ levels were (132.04 ± 18.10) , (232.46 ± 25.29) , (205.98 ± 21.26) , (183.67 ± 20.20) and $(209.05 \pm 19.82) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of T - bet mRNA were 1.00 ± 0.10 , 3.98 ± 0.69 , 2.18 ± 0.21 , 1.95 ± 0.20 and 2.24 ± 0.23 , respectively; the relative expression levels of T - bet protein were 1.00 ± 0.10 , 2.46 ± 0.29 , 1.98 ± 0.21 , 1.67 ± 0.20 and 2.01 ± 0.22 , respectively. When the above - mentioned indicators of the model group were compared with those of the control group, the above - mentioned indicators of the CsA group, the RAP - H combined with CsA group, and the RAP - H group were compared with those of the model group, and the above - mentioned indicators of the RAP - H combined with CsA group were compared with those of the CsA group and the RAP - H group, all the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** CsA combined with RAP can significantly improve the hematopoietic function and cellular immune function of aplastic anemia model mice, which may be related to increasing the levels of bone marrow TPO and VCAM - 1 and regulating the T - bet/IFN - γ signaling pathway.

Key words: cyclosporine A; rapamycin; aplastic anemia; hematopoietic function; T - box transcription factors; interferon - γ

再生障碍性贫血是由多种因素诱发的恶性血液系统疾病,病理特点为全血细胞减少、骨髓增生减低等^[1]。因该病的病程久且治疗较难,临床多用免疫抑制疗法、造血干细胞移植等手段治疗^[2]。环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 是我国免疫抑制治疗的首选药

物,但部分患者存在治疗无应答,复发率较高等问题^[3],故亟须探寻更有效的治疗手段。西罗莫司 (rapamycin, RAP) 是大环内酯类免疫抑制药,可以参与 T 细胞介导的免疫异常,对再生障碍性贫血的治疗有一定效果^[4]。T 盒转录因子 (T - box expressed in T

cells, T-bet)/干扰素- γ (interferon gamma, IFN- γ) 通路的异常活化,与再生障碍性贫血异常亢进的细胞免疫有关^[5]。本研究旨在探讨 RAP 联合 CsA 通过调控 T-bet/IFN- γ 信号通路对再生障碍性贫血小鼠造血功能及骨髓细胞因子的影响。

材料与方法

1 材料

动物 纯系雌性昆明小鼠 (KM96021), 鼠龄 8~12 周, 体质量 17~22 g, 购自厦门万泰沧海生物技术有限公司。动物生产许可证号: SCXK (闽) 2023-0001。本实验经泉州市第一医院动物伦理委员会批准 (伦理批号: 泉一伦【2024】K299 号)。

药物和试剂 RAP, 规格: 每瓶 50 mg, 纯度: 99.34%, 批号: 28153, CsA, 规格: 每瓶 200 mg, 纯度: 99.85%, 批号: 31755, 环磷酰胺, 规格: 每瓶 500 mg, 纯度: $\geq 98.0\%$, 批号: 104230, 均为美国 MCE 公司生产。内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板生成素 (thrombopoietin, TPO)、血管细胞黏附因子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 试剂盒, 均购自上海江莱生物公司; IFN- γ 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒, 均购自上海科艾博生物公司; 抗体, 均购自英国 Abcam 公司; 引物, 均由上海生工生物公司合成。

仪器 BS-600 全自动生化仪, 北京迈瑞医疗公司产品; BX51 荧光显微镜, 日本 Olympus 公司产品; Multiskan SkyHigh 酶标仪, 美国 Thermo Fisher 公司产品; QuantStudio 5 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 系统, 美国 ABI 公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建^[6]

小鼠皮下注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 环磷酰胺, 隔天 1 次, 共 4 次; 同时吸入甲苯, 浓度 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每天 1 次, 连续 8 d。造模成功的判定标准: 小鼠外周血三系细胞减少, 网织红细胞减少, 骨髓检查显示骨髓至少一部位增生低下, 骨髓小粒成分中非造血细胞增多 (脂肪细胞), 可判定造模成功。

2.2 动物分组与给药方法

将纯系雌性昆明小鼠随机分为以下 7 组, 每组各 10 只。对照组: 不做任何处理; 模型组: 按“2.1”的方法建立再生障碍性贫血模型小鼠; CsA 组: 在模型组的基础上每天给予 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 CsA, 腹腔注射 5 d;

RAP-L 联合 CsA 组: 在模型组的基础上每天给予 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 RAP 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 CsA, 腹腔注射 5 d; RAP-M 联合 CsA 组: 在模型组的基础上每天给予 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 RAP 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 CsA, 腹腔注射 5 d; RAP-H 联合 CsA 组: 在模型组的基础上每天给予 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 RAP 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 CsA, 腹腔注射 5 d; RAP-H 组: 在模型组的基础上每天给予 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 RAP, 腹腔注射 5 d。

2.3 外周血象检测^[7]

各组小鼠眼球取血, 用肝素钠抗凝, 用全自动生化分析仪检测外周血三系细胞 [白细胞 (white blood cell, WBC)、红细胞 (red blood cell, RBC)、血小板 (platelet, PLT)] 和血红蛋白 (hemoglobin, HGB) 水平。

2.4 骨髓病理形态观察^[7]

剥离小鼠右侧股骨, 4% 多聚甲醛固定, 10% 的 EDTA 脱钙液脱钙, 乙醇梯度脱水, 常规石蜡包埋切片 ($5 \mu\text{m}$), 用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法观察骨髓组织病理情况, 并进行骨髓病理损伤评分。

2.5 骨髓造血相关因子水平检测

用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测各组小鼠骨髓上清液中 VEGF、TPO、VCAM-1 水平, 具体操作遵照试剂盒说明书。

2.6 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 法检测骨髓组织中 TPO 阳性表达水平^[8]

取“2.4”制作的石蜡切片, 脱蜡水化后, 滴加 3% 双氧水室温孵育 20 min, 枸橼酸钠缓冲液抗原修复 20 min, 自然晾至室温, 5% 牛血清白蛋白封闭 30 min, 滴加 TPO 抗体 (1:1 000), 4°C 孵育过夜, 第 2 天恢复至室温, 滴加生物素标记的二抗孵育 40 min, 3,3'-二氨基联苯胺显色后, 苏木精复染, 经盐酸乙醇分化, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明后封片观察。

2.7 qRT-PCR 检测骨髓单个核细胞 T-bet 和 GATA 结合蛋白 3 (GATA binding protein 3, GATA3) mRNA 的相对表达水平

取小鼠股骨的骨髓细胞制成悬液, 将其加入含有淋巴细胞分离液的离心管中, 以 $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min, 小心吸取中间的单个核细胞层, 用 TRIzol 试剂提取骨髓单个核细胞的 RNA, 逆转录为 cDNA, 在 qRT-PCR 仪中反应, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 T-bet 和 GATA3 mRNA 相对表达水平。

2.8 蛋白质印迹法检测骨髓单个核细胞 T-bet 和 GATA3 蛋白的表达水平^[9]

骨髓单个核细胞分离方法同“2.7”, 用细胞裂解

液提取骨髓单个核细胞的总蛋白,用二喹啉甲酸法测定蛋白浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,脱脂牛奶封闭,加入相应的一抗 T - bet (1:1 000) 和 GATA3 (1:1 000) 4 ℃ 孵育过夜,室温孵育辣根过氧化物标记的山羊抗兔二抗(1:1 000),化学发光显影剂反应后,成像系统进行曝光显影。

2.9 ELISA 法检测骨髓单个核细胞 IFN - γ 和 TNF - α 的表达水平

收集各组小鼠的骨髓单个核细胞,按 ELISA 试剂盒的操作说明检测 IFN - γ 和 TNF - α 表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间比较用 LSD - t 检验。

结 果

1 RAP 和 CsA 联合对再生障碍性贫血小鼠外周血象的影响

对照组不做任何处理;模型组用皮下注射 50 mg $\cdot$ kg⁻¹ 环磷酰胺并吸入 30 mg $\cdot$ L⁻¹ 甲苯构建再生障碍性贫血模型;CsA 组基于模型组,腹腔注射 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ CsA;RAP - L 联合 CsA 组基于模型组,腹腔注射 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ CsA 和 0.1 mg $\cdot$ kg⁻¹ RAP;RAP - M 联合 CsA 组基于模型组,腹腔注射 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ CsA 和 0.5 mg $\cdot$ kg⁻¹ RAP;RAP - H 联合 CsA 组基于模型组,腹腔注射 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ CsA 和 1 mg $\cdot$ kg⁻¹ RAP;RAP - H 组基于模型组,腹腔注射 1 mg $\cdot$ kg⁻¹ RAP。

模型组的 WBC、RBC、HGB 和 PLT 水平与对照组比较,均显著降低(均 $P < 0.001$);CsA 组、RAP - L 联合 CsA 组、RAP - M 联合 CsA 组、RAP - H 联合 CsA 组和 RAP - H 组小鼠的 WBC、RBC、HGB 和 PLT 水平与模型组比较,均显著升高(均 $P < 0.001$);相较于 CsA 组,RAP - L 联合 CsA 组小鼠的 WBC 和 RBC 水平均无显著性差异(均 $P > 0.05$),HGB 和 PLT 水平均显著升高(均 $P < 0.001$);相较于 RAP - H 组,RAP - L 联合 CsA 组小鼠的 WBC 水平无显著性差异($P > 0.05$),RBC、HGB 和 PLT 水平均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.001$),RAP - M 联合 CsA 组和 RAP - H 联合 CsA 组小鼠的 WBC、RBC、HGB 和 PLT 水平均显著升高($P < 0.01$, $P < 0.001$)。结果见表 1。这提示 RAP 和 CsA 联合可以显著改善再生障碍性贫血小鼠外周血象水平,且当 RAP 为高剂量时效果最佳,故选择 RAP - H 联合 CsA 进行后续实验。

2 RAP 和 CsA 联合对再生障碍性贫血小鼠骨髓病理形态的影响

HE 染色结果显示:对照组小鼠骨髓增生活跃,各系造血细胞形态正常,分布均匀;模型组与对照组比较,小鼠骨髓腔明显空虚,造血细胞数量明显减少,被大量的脂肪细胞代替;CsA 组、RAP - H 联合 CsA 组和 RAP - H 组与模型组比较,小鼠骨髓出现不同程度的有核细胞逐渐增多,脂肪细胞减少的现象,见图 1。对照组、模型组、CsA 组、RAP - H 联合 CsA 组和 RAP - H 组的骨髓病理损伤评分分别为(0.20 $\pm$ 0.04)、(2.50 $\pm$ 0.25)、(1.10 $\pm$ 0.10)、(1.00 $\pm$ 0.11)和(1.20 $\pm$ 0.16)分。模型组的骨髓病

表 1 各组小鼠外周血象水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of peripheral blood levels in mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	WBC($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	RBC($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	HGB(g $\cdot L^{-1}$)	PLT($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
Control	10	7.36 $\pm$ 0.75	8.48 $\pm$ 0.89	150.64 $\pm$ 17.75	765.98 $\pm$ 108.75
Model	10	0.32 $\pm$ 0.05***	2.14 $\pm$ 0.25***	20.15 $\pm$ 2.23***	76.35 $\pm$ 7.62***
CsA	10	1.28 $\pm$ 0.22###	3.54 $\pm$ 0.54###	46.23 $\pm$ 4.45###	132.21 $\pm$ 16.15###
RAP - L combined with CsA	10	1.43 $\pm$ 0.25###	3.93 $\pm$ 0.46###□	57.76 $\pm$ 6.73###△△△□□□	183.96 $\pm$ 30.61###△△△□□□
RAP - M combined with CsA	10	2.06 $\pm$ 0.31###△△△□□□	4.14 $\pm$ 0.51###△□□	66.54 $\pm$ 10.65###△△△□□□	206.23 $\pm$ 35.75###△△△□□□
RAP - H combined with CsA	10	4.23 $\pm$ 0.64###△△△□□□	6.12 $\pm$ 0.74###△△△□□□	72.17 $\pm$ 11.24###△△△□□□	319.56 $\pm$ 55.32###△△△□□□
RAP - H	10	1.47 $\pm$ 0.22###	3.26 $\pm$ 0.61###	38.33 $\pm$ 6.94###	126.35 $\pm$ 20.58###

WBC: White blood cell; RBC: Red blood cell; HGB: Hemoglobin; PLT: Platelet; Control group: No treatment; Model group: An aplastic anemia model was established by subcutaneously injecting cyclophosphamide at a dose of 50 mg $\cdot$ kg⁻¹ and inhaling toluene at a concentration of 30 mg $\cdot$ L⁻¹; CsA group: On the basis of the model group, 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ CsA; RAP - L combined with CsA group: On the basis of the model group, 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ CsA and 0.1 mg $\cdot$ kg⁻¹ RAP; RAP - M combined with CsA group: On the basis of the model group, 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ CsA and 0.5 mg $\cdot$ kg⁻¹ RAP; RAP - H combined with CsA group: On the basis of the model group, 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ CsA and 1 mg $\cdot$ kg⁻¹ RAP; RAP - H group: On the basis of the model group, 1 mg $\cdot$ kg⁻¹ RAP; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, ### $P < 0.001$; Compared with CsA group, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.001$; Compared with RAP - H group, □ $P < 0.05$, □□ $P < 0.001$, □□□ $P < 0.001$.

理损伤评分与对照组比较,CsA组、RAP-H联合CsA组和RAP-H组的骨髓病理损伤评分与模型组比较,RAP-H联合CsA组的骨髓病理损伤评分与CsA组相比较以及RAP-H联合CsA组的骨髓病理损伤评分与RAP-H组相比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中,RAP-H联合CsA组效果最显著。

3 RAP和CsA联合对再生障碍性贫血小鼠骨髓VEGF、TPO、VCAM-1水平的影响

模型组小鼠的TPO和VCAM-1水平与对照组比较,均显著降低(均 $P < 0.001$);CsA组、RAP-H联合CsA组和RAP-H组小鼠的TPO和VCAM-1水平与模型组比较,均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$);RAP-H联合CsA组小鼠的TPO和VCAM-1水平与CsA组比较,均显著升高(均 $P < 0.05$);RAP-H联合CsA组小鼠的TPO和VCAM-1水平与RAP-H组比较,均显著升高(均 $P < 0.05$)。模型组小鼠的VEGF水平与对照组比较,CsA组、RAP-H联合CsA组和RAP-H组小鼠的VEGF水平与模型组比较,RAP-H联合CsA组小鼠的VEGF水平与CsA组比较,RAP-H联合CsA组小鼠的VEGF水平与RAP-H组比较,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结果见表2。

对照组、模型组、CsA组、RAP-H联合CsA组和

RAP-H组的TPO阳性表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.42 ± 0.05 、 0.64 ± 0.07 、 0.75 ± 0.08 和 0.66 ± 0.07 。模型组的TPO阳性表达水平与对照组比较,CsA组、RAP-H联合CsA组和RAP-H组的TPO阳性表达水平与模型组比较,RAP-H联合CsA组的TPO阳性表达水平与CsA组比较,RAP-H联合CsA组的TPO阳性表达水平与RAP-H组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果见图2。

4 RAP和CsA联合对再生障碍性贫血小鼠骨髓单个核细胞T-bet和GATA3 mRNA表达水平的影响

对照组、模型组、CsA组、RAP-H联合CsA组和RAP-H组的T-bet mRNA相对表达水平分别为 1.00 ± 0.10 、 3.98 ± 0.69 、 2.18 ± 0.21 、 1.95 ± 0.20 和 2.24 ± 0.23 ,GATA3 mRNA相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.34 ± 0.04 、 0.68 ± 0.07 、 0.77 ± 0.08 和 0.61 ± 0.07 。模型组的上述指标与对照组比较,CsA组、RAP-H联合CsA组和RAP-H组的上述指标与模型组比较,RAP-H联合CsA组的上述指标与CsA组比较,RAP-H联合CsA组的上述指标与RAP-H组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

5 RAP和CsA联合对再生障碍性贫血小鼠骨髓单个核细胞T-bet和GATA3蛋白表达水平的影响

对照组、模型组、CsA组、RAP-H联合CsA组和RAP-H组的T-bet蛋白相对表达水平分别为

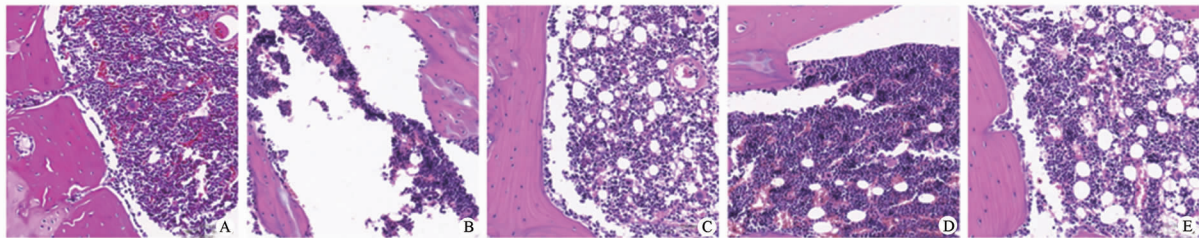


图1 各组小鼠骨髓病理形态(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

Figure 1 Bone marrow pathological morphology of mice in each group (hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

A: Control group; B: Model group; C: CsA group; D: RAP-H combined with CsA; E: RAP-H group.

表2 各组小鼠的骨髓内皮生长因子(VEGF)、血小板生成素(TPO)和血管细胞黏附因子-1(VCAM-1)水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of bone marrow vascular endothelial growth factor (VEGF), thrombopoietin (TPO), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) levels in mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	VEGF($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TPO($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	VCAM-1($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Control	284.21 ± 40.04	195.48 ± 28.15	213.46 ± 32.33
Model	252.68 ± 35.25	$145.81 \pm 15.24^{***}$	$132.81 \pm 21.94^{***}$
CsA	261.74 ± 26.21	$169.76 \pm 20.26^{##}$	$185.49 \pm 19.65^{###}$
RAP-H combined with CsA	276.05 ± 28.24	$190.54 \pm 22.37^{###\Delta\Box}$	$204.19 \pm 19.82^{###\Delta\Box}$
RAP-H	263.26 ± 27.66	$165.52 \pm 20.29^{\#}$	$183.67 \pm 20.87^{###}$

Dose and n refer to table 1; Compared with control group, $***P < 0.001$; Compared with model group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$; Compared with CsA group, $^{\Delta}P < 0.05$; Compared with RAP-H group, $^{\Box}P < 0.05$.

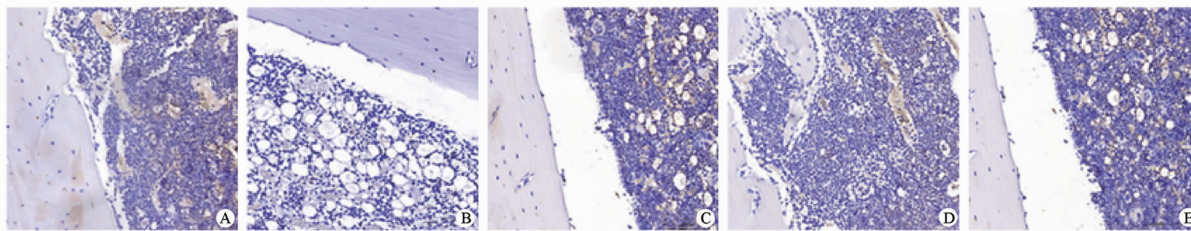


图2 各组小鼠的TPO阳性表达情况(免疫组织化学法, $\times 100$)

Figure 2 Positive expression of TPO in mice of each group (immunohistochemistry, $\times 100$)

A – E refer to figure 1.

1.00 ± 0.10 、 2.46 ± 0.29 、 1.98 ± 0.21 、 1.67 ± 0.20 和 2.01 ± 0.22 , GATA3 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 0.54 ± 0.07 、 0.71 ± 0.08 、 0.82 ± 0.09 和 0.69 ± 0.07 。模型组的上述指标与对照组比较, CsA 组、RAP – H 联合 CsA 组和 RAP – H 组的上述指标与模型组比较, RAP – H 联合 CsA 组的上述指标与 CsA 组比较, RAP – H 联合 CsA 组的上述指标与 RAP – H 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 见图 3。

6 RAP 和 CsA 联合对再生障碍性贫血小鼠骨髓单个核细胞 IFN – γ 和 TNF – α 表达水平的影响

对照组、模型组、CsA 组、RAP – H 联合 CsA 组和 RAP – H 组的 IFN – γ 表达水平分别为 (132.04 ± 18.10) 、 (232.46 ± 25.29) 、 (205.98 ± 21.26) 、 (183.67 ± 20.20) 和 (209.05 ± 19.82) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, TNF – α 表达水平分别为 (31.27 ± 3.12) 、 (130.54 ± 20.07) 、 (112.71 ± 12.08) 、 (99.82 ± 10.09) 和 (110.69 ± 11.07) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。模型组的上述指标与对照组比较, CsA 组、RAP – H 联合 CsA 组和 RAP – H 组的上述指标与模型组比较, RAP – H 联合 CsA 组的上述指标与 CsA 组比较, RAP – H 联合 CsA 组的上述指标与 RAP – H 组比较, 在统计上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

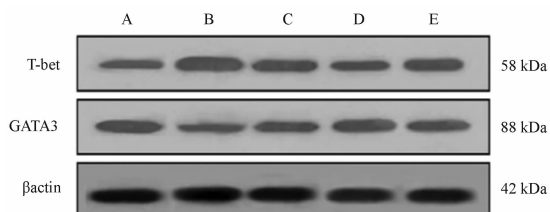


图3 用蛋白质印迹法检测各组小鼠骨髓单个核细胞 T 盒转录因子(T – bet)和 GATA 结合蛋白 3(GATA3)蛋白表达水平

Figure 3 Western blot detection of T – box expressed in T cells (T – bet) and GATA binding protein 3 (GATA3) protein expression levels in bone marrow mononuclear cells of mice in each group A – E refer to figure 1.

讨 论

再生障碍性贫血的发病机制主要包括生活环境、遗传变异、免疫功能紊乱、造血微环境异常、造血干细胞缺陷等因素^[10]。临床研究证实, CsA 联合阿伐曲泊帕治疗输血依赖非重型再生障碍性贫血与 CsA 联合艾曲波帕治疗重型再生障碍性贫血均是安全有效的^[11-12]。外周血常规检测是评估再生障碍性贫血动物模型的基本方法, 研究发现, 用环磷酰胺诱导再生障碍性贫血小鼠模型的方法操作简单, 且成功造模小鼠的外周血三系细胞数(WBC、RBC、PLT)与 HGB 浓度明显降低, 骨髓造血组织减少, 出现大量脂肪空泡等非造血组织, 符合再生障碍性贫血的临床外周血与骨髓造血表现^[13]。故本研究选择此实验方案造模, 结果显示再生障碍性贫血小鼠的外周血象及骨髓病理形态与既往研究结果相一致, 表明再生障碍性贫血小鼠模型建立成功。进一步研究发现, 不同剂量的 RAP 联合 CsA 均可以改善模型小鼠的外周血象水平, 且以高剂量时的改善效果最好, 故选择高剂量的 RAP 联合 CsA 展开后续研究。

VEGF、TPO 与 VCAM – 1 是骨髓造血微环境的调节因子。VEGF 是促血管生成的中枢调控因子, 可以通过促进血管新生, 阻碍内皮细胞凋亡来影响造血^[8]。TPO 有调节造血干细胞生成、分化的作用。VCAM – 1 有利于造血干细胞黏附在血管内皮细胞上并增加其归巢效率, 帮助干细胞随血液循环到达其他部位^[14]。邓梦云等^[7]研究发现, 补髓生血丸可以通过提高 VCAM – 1 和 VEGF 水平, 改善骨髓造血微环境, 提高再生障碍性贫血模型小鼠的造血功能。本研究发现, 模型组与对照组相比, 小鼠的骨髓病理损伤评分显著升高, 骨髓的 TPO 和 VCAM – 1 水平均显著降低; CsA 组、RAP – H 联合 CsA 组与 RAP – H 组的病理损伤评分均较模型组显著降低, TPO 和 VCAM – 1 水平均较模型组显著提高; RAP – H 联合 CsA 组的病理

损伤评分均较 CsA 组和 RAP-H 组显著降低,TPO 和 VCAM-1 水平均较 CsA 组和 RAP-H 组显著提高;表明 2 种药物单一干预与联合干预均可以减轻再生障碍性贫血模型小鼠的骨髓损伤,并促进造血功能恢复,且药物联合干预的改善效果优于各药物单一干预。分析原因可能为 RAP 对细胞因子信号转导通路具有独特的抑制作用,联合 CsA 有良好的抗排斥协同作用。

T-bet、GATA3、IFN- γ 、TNF- α 与 T 淋巴细胞免疫功能失常相关。T-bet、GATA3 是调控 Th0 细胞向 Th1/Th2 细胞分化的重要因子,前者促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化,并激活 IFN- γ 、TNF- α 基因转录;后者促进 Th0 细胞向 Th2 细胞分化,并抑制 Th1 型细胞因子合成^[15]。在再生障碍性贫血中,T-bet 与 GATA3 水平失调,导致 Th1/Th2 平衡被打破,进而抑制骨髓造血。贾晋松^[16]研究发现,T 淋巴细胞释放 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子诱导骨髓造血细胞凋亡,抑制骨髓正常造血,引发骨髓衰竭。本研究发现,相较于模型组,CsA 组、RAP-H 联合 CsA 组与 RAP-H 组的 T-bet 表达水平均显著降低,GATA3 表达水平均显著升高,IFN- γ 和 TNF- α 水平均显著降低;相较于 CsA 组和 RAP-H 组,RAP-H 联合 CsA 组的 T-bet 表达水平均显著降低,GATA3 表达水平均显著升高,IFN- γ 和 TNF- α 水平均显著降低;说明 CsA 与 RAP 单一用药及联合用药均能够通过促进 T-bet、GATA3 平衡恢复,改善细胞免疫紊乱,发挥治疗再生障碍性贫血的作用,且 CsA 与 RAP 联合用药的治疗作用优于各药物单一干预,表明此种联合应用的免疫抑制疗法效果更佳。

本研究提示:CsA 联合 RAP 可以明显改善再生障碍性贫血模型小鼠的造血功能及细胞免疫功能,可能与提高骨髓 TPO 和 VCAM-1 水平,调节 T-bet/IFN- γ 信号通路有关。

参考文献:

- [1] 张小敏,朱玲玲,肖扬. 再生障碍性贫血相关信号通路的研究进展[J]. 中国病理生理杂志,2021,37(11):2094—2099.
- [2] 付佳琪,陈修保,崔兴,等. 当归多糖调节骨髓造血微环境治疗再生障碍性贫血的机制[J]. 中国组织工程研究,2025,29(1):

44—51.

- [3] 陈姗姗,吴泽彬,张小敏,等. 三七总皂苷通过调节 TLR4/TLR2-NF- κ B 信号通路对再生障碍性贫血小鼠骨髓造血功能的影响[J]. 中国药理学通报,2022,38(7):1052—1058.
- [4] 谷昊,吴润晖. 雷帕霉素治疗免疫介导血细胞减少症相关机制及临床应用研究进展[J]. 中国实验血液学杂志,2018,26(6):1836—1840.
- [5] SUN S,ZHANG Y,GU X,et al. Chinese herbal formula, modified guilu erxian glue, alleviates apoptosis of hematopoietic stem cells by regulating SLAM-SAP signal pathway in aplastic anemia mice model [J/OL]. J Ethnopharmacol, 2024, 335: e118575. 2024-07-14 [2024-10-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39009326/>.
- [6] 陈维达,徐龙晋,张静,等. 当归补血汤对再障小鼠骨髓造血及线粒体自噬的实验研究[J]. 中药药理与临床,2019,35(1):14—18.
- [7] 邓梦云,杨丽娟,李莉,等. 补髓生血丸对再生障碍性贫血小鼠造血功能及骨髓 VEGF、TPO、VCAM-1 水平的影响[J]. 中药新药与临床药理,2023,34(1):42—48.
- [8] 杨志勇,邓梦云,李莉,等. 补髓生血丸对再生障碍性贫血模型小鼠骨髓 VEGF 及 Notch-1 蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床,2023,39(9):14—18.
- [9] 张娜,赵俊云,薛慧清,等. 黄芪糖蛋白对胶原诱导性关节炎小鼠脾组织 T-bet 及 GATA-3 表达的影响[J]. 世界中医药,2017,12(5):1109—1113.
- [10] 立新,苏力德,奥·乌力吉,等. 再生障碍性贫血致病分子机制研究进展[J]. 中国现代应用药学,2021,38(17):2150—2155.
- [11] 张婷,徐丹,陈小玉,等. 阿伐曲泊帕联合环孢素治疗输血依赖非重型再生障碍性贫血研究[J]. 中国实用内科杂志,2024,44(4):302—306.
- [12] 焦雯静,刘立民,周惠芬,等. 艾曲波帕联合环孢素 A 治疗重型再生障碍性贫血疗效及安全性观察[J]. 中国实用内科杂志,2022,42(7):573—576.
- [13] 石健菲,焦丹丽,赵琛,等. 环磷酰胺联合环孢素介导的获得性再生障碍性贫血小鼠模型的建立[J]. 中国实验血液学杂志,2022,30(1):222—226.
- [14] KONG D H,KIM Y K,KIM M R,et al. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer[J]. Int J Mol Sci,2018,19(4):1057.
- [15] 朱晓芳,胡宏叶,李永吉,等. 三氧化二砷对 MRL/lpr 狼疮鼠 T-bet/GATA3 信号通路的影响[J]. 中国病理生理杂志,2017,33(9):1708—1712.
- [16] 贾晋松. 重型再生障碍性贫血细胞免疫功能异常与强化免疫抑制治疗的关系[J]. 中国实用内科杂志,2021,41(1):40—44.

(收稿日期 2024-12-29)