

骨髓增生异常综合征模型大鼠骨髓造血：活髓方干预免疫检查点的作用机制

卓秋燕¹, 蒋群¹, 夏思¹, 卢诗颖¹, 刘燕娣², 戴嫩¹<https://doi.org/10.12307/2025.558>

投稿日期: 2024-07-20

采用日期: 2024-09-21

修回日期: 2024-11-05

在线日期: 2024-12-18

中图分类号:

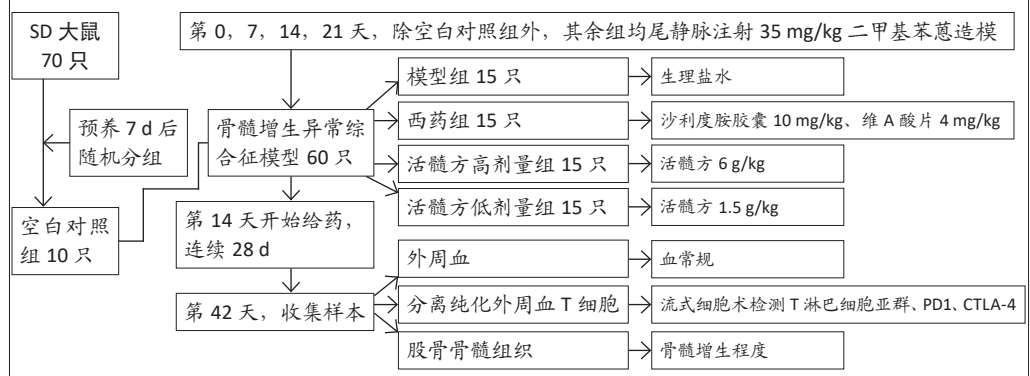
R459.9; R318; R285.5

文章编号:

2095-4344(2025)36-07735-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 活髓方干预免疫检查点对骨髓增生异常综合征模型大鼠骨髓造血的影响



文题释义:

免疫检查点: 逆转肿瘤免疫抑制功能的CTLA-4、PD-1/PD-L1等免疫检查点在血液肿瘤及实体肿瘤治疗中取得了令人振奋的效果, 成为治疗癌症的新手段, 并在骨髓增生异常综合征中显示出一定的优势。

活髓方: 名中医陈志雄教授临床应用补虚解毒法的经验方联合西药治疗骨髓增生异常综合征, 对免疫及造血调节起到增效减毒的协同作用, 高效低毒的经验方剂活髓方能改善骨髓增生异常综合征患者的生存预后。

摘要

背景: 既往研究表明经验方剂活髓方对骨髓增生异常综合征患者的免疫及造血调节起到增效减毒的协同作用, 但具体机制尚未明确。

目的: 探讨活髓方对骨髓增生异常综合征模型大鼠骨髓造血的影响及机制。

方法: 70只SD大鼠采用随机数字表法分为正常对照组10只、模型组15只、西药组15只、活髓方低剂量组15只、活髓方高剂量组15只。除正常对照组外, 其余4组采用尾静脉注射二甲苯基诱导建立大鼠骨髓增生异常综合征模型, 造模后正常对照组、模型组给予生理盐水, 西药组给予沙利度胺胶囊10 mg/kg、维A酸片4 mg/kg, 活髓方低、高剂量组分别给予活髓方1.5, 6 g/kg, 每天灌胃1次, 连续给药28 d, 取外周血和股骨骨髓组织, 检测外周血常规、骨髓活检造血增殖情况, 采用流式细胞术检测T淋巴细胞亚群及T淋巴细胞上CTLA-4和PD-1的表达。

结果与结论: ①与正常对照组相比, 模型组外周血白细胞、中性粒细胞、血红蛋白、血小板和CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平显著下降($P < 0.05$), CD4⁺PD-1⁺、CD8⁺PD-1⁺、CD4⁺CTLA-4⁺和CD8⁺CTLA-4⁺表达显著上调($P < 0.05$); ②与模型组相比, 各给药组的骨髓增生程度均有改善, 但组间无统计学差异($P > 0.05$); ③与模型组相比, 活髓方高剂量组白细胞、血红蛋白、血小板和CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平显著升高($P < 0.05$), CD8⁺水平显著降低($P < 0.05$), CD4⁺PD-1⁺、CD8⁺PD-1⁺、CD4⁺CTLA-4⁺和CD8⁺CTLA-4⁺表达水平下降但无统计意义($P > 0.05$); ④西药组与活髓方高剂量组显示出相似的疗效: 活髓方高剂量组较低剂量组各指标改善均有优势。结果表明, 活髓方可改善骨髓增生异常综合征模型大鼠的骨髓造血, 提高CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平, 下调CD4⁺PD-1⁺、CD8⁺PD-1⁺、CD4⁺CTLA-4⁺和CD8⁺CTLA-4⁺表达, 可能与免疫负调控机制相关。

关键词: 骨髓增生异常综合征; 活髓方; 骨髓造血; 免疫检查点; 外周血T淋巴细胞亚群; CTLA-4; PD-1; SD大鼠; 工程化细胞

Bone marrow hematopoiesis in rats with myelodysplastic syndrome: action mechanism of Huosuo Formula in intervening immune checkpoints

Zhuo Qiuyan¹, Jiang Qun¹, Xia Si¹, Lu Shiyang¹, Liu Yandi², Dai Mei¹

¹Department of Hematology, ²Department of Pathology, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510130, Guangdong Province, China

Zhuo Qiuyan, MS, Physician, Department of Hematology, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510130, Guangdong Province, China

Corresponding author: Dai Mei, MS, Chief physician, Department of Hematology, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510130, Guangdong Province, China

广州医科大学附属中医医院, ¹血液科, ²病理科, 广东省广州市 510130

第一作者: 卓秋燕, 女, 1992年生, 广东省湛江市人, 汉族, 2019年广州中医药大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事中医药治疗血液疾病研究。

通讯作者: 戴嫩, 硕士, 主任中医师, 广州医科大学附属中医医院血液科, 广东省广州市 510130

<https://orcid.org/0009-0003-0681-235X> (戴嫩)

基金资助: 广州市科技厅项目(202102080138), 项目负责人: 戴嫩; 广州市三级名中医工作室建设项目(穗卫中医[2022]3号),

项目负责人: 戴嫩

引用本文: 卓秋燕, 蒋群, 夏思, 卢诗颖, 刘燕娣, 戴嫩. 骨髓增生异常综合征模型大鼠骨髓造血: 活髓方干预免疫检查点的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):7735-7742.



Abstract

BACKGROUND: Previous studies have shown that *Huosui* Formula has a synergistic effect on the immune and hematopoietic regulation of patients with myelodysplastic syndrome, but the specific mechanism is not yet clear.

OBJECTIVE: To explore the effect and mechanism of *Huosui* Formula on bone marrow hematopoiesis in rats with myelodysplastic syndrome.

METHODS: A total of 70 SD rats were randomly divided into a normal control group ($n=10$), a model group ($n=15$), a western medicine group ($n=15$), a low-dose *Huosui* Formula group ($n=15$), and a high-dose *Huosui* Formula group ($n=15$). Except for the normal control group, the other four groups were injected with dimethylbenzanthracene via the tail vein to induce the establishment of rat myelodysplastic syndrome models. After modeling, the normal control group and the model group were given normal saline; the western medicine group was given thalidomide capsules 10 mg/kg and retinoic acid tablets 4 mg/kg, and the low-dose *Huosui* Formula group and the high-dose *Huosui* Formula group were given 1.5 and 6 g/kg *Huosui* Formula, respectively, by intragastric administration once a day for 28 consecutive days. Peripheral blood and femoral bone marrow tissue were collected to detect peripheral blood routine and bone marrow biopsy hematopoietic proliferation. Flow cytometry was used to detect T lymphocyte subsets and the expression of CTLA-4 and PD-1 on T lymphocytes.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the normal control group, peripheral blood leukocyte, neutrophil, hemoglobin, platelet, and $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$ levels were decreased in the model group significantly ($P < 0.05$), while $CD4^+PD-1^+$, $CD8^+PD-1^+$, $CD4^+CTLA-4^+$, and $CD8^+CTLA-4^+$ expressions were significantly upregulated ($P < 0.05$). (2) In all dosage groups, myelopoietic proliferation was increased compared with the model group, with no significant difference between the groups ($P > 0.05$). (3) Compared with the model group, leukocytes, hemoglobin, platelets, and $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$ were significantly elevated in the high-dose *Huosui* Formula group ($P < 0.05$), the expression of $CD8^+$ was significantly lower ($P < 0.05$), and the levels of $CD4^+PD-1^+$, $CD8^+PD-1^+$, $CD4^+CTLA-4^+$, and $CD8^+CTLA-4^+$ were down-regulated but not statistically significant ($P > 0.05$). (4) The western medicine group and the high-dose *Huosui* Formula group showed similar efficacy. The improvement of each index in the high-dose *Huosui* Formula group was superior to that in the low-dose *Huosui* Formula group. These findings indicate that *Huosui* Formula can improve the bone marrow hematopoiesis in myelodysplastic syndrome model rats, increase the levels of $CD4^+$, and $CD4^+/CD8^+$ while down-regulate the expression levels of $CD4^+PD-1^+$, $CD8^+PD-1^+$, $CD4^+CTLA-4^+$, and $CD8^+CTLA-4^+$. These observations suggest a link to the negative immunoregulation mechanism.

Key words: myelodysplastic syndrome; *Huosui* formula; bone marrow hematopoiesis; immune checkpoint; peripheral blood T lymphocyte subset; CTLA-4; PD-1; SD rat; engineered cell

Funding: Guangzhou Science and Technology Department Project, No. 202102080138 (to DM); Guangzhou Municipal Tier-3 Famous Traditional Chinese Medicine Studio Construction Project, No. [2022]3 (to DM)

How to cite this article: ZHUO QY, JIANG Q, XIA S, LU SY, LIU YD, DAI M. Bone marrow hematopoiesis in rats with myelodysplastic syndrome: action mechanism of *Huosui* Formula in intervening immune checkpoints. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(36):7735-7742.

0 引言 Introduction

骨髓增生异常综合征是一组血液系统恶性肿瘤，主要特点是克隆性造血、细胞形态发育异常和血细胞减少，患者有发生贫血、出血和感染一系列症状的风险，易进展为急性白血病或骨髓衰竭^[1]。近10余年应用去甲基化药物治疗骨髓增生异常综合征，并未使其预后出现根本性改变，造血干细胞移植仍是目前唯一治愈骨髓增生异常综合征的手段^[2]。然而大部分患者不耐受化疗药物，对去甲基化治疗耐药，骨髓移植存在高非复发死亡率和移植植物抗宿主病以及输血依赖等问题，对国民健康危害大，社会负担明显增加。

目前逆转肿瘤免疫抑制功能的细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)、程序性死亡受体1(programmed death receptor 1, PD-1)/程序性死亡配体1(programmed death ligand 1, PD-L1)等免疫检查点在血液肿瘤及实体肿瘤治疗中取得了令人振奋的效果，肿瘤免疫治疗成为新一代有效的癌症治疗手段，在骨髓增生异常综合征中也显示出一定的优势^[3]。中医药对免疫及造血调节起到增效减毒的协同作用^[4-5]。研究团队既往应用名中医陈志雄教授补虚解毒法的经验方治疗骨髓增生异常综合征，亦观察到相似的疗效^[6-7]，然而其改善造血及免疫调节的作用机制有待进一步深入研究。为寻求更高效低毒的治疗方案，改善骨髓增生异常综合征患者的生存预后，该研究通过二甲基苯蒽诱导建立大鼠骨髓增生异常综合征模型，探讨补虚解毒经验方“活髓方”对骨髓增生异常综合征模型大鼠造血及免疫的影

响，为临床选用活髓方提供客观依据，为中医药的扩大应用提供科学理论支持。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 单因素观察分析动物实验，采用单盲法将SD大鼠随机编号分组。多组数据比较方差齐性采用单因素方差分析，方差不齐采用韦尔奇检验；组间两两数据比较采用LSD-t检验；方差不齐采用邓尼特T3检验。非正态分布采用非参数秩和检验进行组间比较。

1.2 时间及地点 实验于2022年1月至2023年6月在广州中医药大学三元里实验动物中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级SD大鼠70只，雌雄各半，4周龄，体质量(110±10)g，由广州中医药大学实验动物中心提供，动物生产许可证号：SCXK(粤)2018-0001。实验经广州中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号：20211104005)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 实验药物 活髓方由鹿茸、人参、青黛、莪术等组成，经广州医科大学附属中医医院中药房药师鉴定入库。大鼠用药剂量按人60kg的6倍计算，15g/60kg×6=1.5g/kg。设置低、高剂量比为1:4，即每天给予低、高剂量分别为1.5, 6g/kg。各种药物常规煎煮后过滤药渣，水浴蒸发至含生药0.3, 1.2g/mL，冷却置于4℃冰箱备用。

沙利度胺胶囊, 规格: 25 mg, 产品批号: 210407, 购自苏州长征-欣凯制药有限公司; 维 A 酸片, 规格: 20 mg, 产品批号: 210602, 购自山东良福制药有限公司。沙利度胺胶囊 10 mg/kg、维 A 酸片 4 mg/kg, 用 0.9% 氯化钠溶液配制质量浓度分别为 2, 0.8 mg/mL 混悬液, 置于 4 °C 冰箱备用。

1.3.3 主要试剂 二甲基苯葱、胎牛血清、泊洛沙姆 188 购自广州威佳科技有限公司; 淋巴细胞分离液、红细胞裂解液、CD3-PE/CY5.5、CD4-PE/CY7、CD8-APC、CD152-PE 购自深圳市达科为生物技术股份有限公司; PD-1-FITC 购自英国 Biorbyt 公司; PBS、1640 培养基购自广州市超博科技有限公司。

1.3.4 主要仪器 TEK-VET5 全自动血液分析仪购自江西特康科技有限公司; 奥林巴斯 BX53 研究级正置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司; BD LSRFortessa 流式细胞分析仪购自美国 BD 公司; TGL-18C-C 型高速台式离心机购自上海安亭科学仪器厂; Sartorius 微量天平购自北京赛多利斯天平有限公司。

1.4 实验方法 将 70 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为 5 组: 正常对照组 10 只、模型组 15 只、西药组 15 只、活髓方低剂量组 15 只、活髓方高剂量组 15 只。将二甲基苯葱溶于灭菌后的食用橄榄油, 质量浓度为 43 mg/mL, 添加乳化剂泊洛沙姆 188(配制成为 50 g/L), 使用超声波清洗机充分溶解。SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 按冯宝章等^[8]造模方法, 除正常对照组外, 其余 4 组在实验第 0, 7, 14, 21 天, 将二甲基苯葱按 35 mg/kg 剂量尾静脉注射, 建立骨髓增生异常综合征大鼠模型。

在造模第 14 天开始给药, 正常对照组、模型组给予生理盐水, 西药组给予沙利度胺胶囊 10 mg/kg、维 A 酸片 4 mg/kg, 中药低、高剂量组分别给予活髓方 1.5, 6 g/kg。每天灌胃 1 次, 连续给药 28 d。

1.5 主要观察指标

1.5.1 临床体征 观察各组大鼠的精神活动、出血、皮下瘀斑瘀点、皮毛光泽度、进食饮水、体质量变化等情况。

1.5.2 外周血常规 实验结束后, 将大鼠用 3% 戊巴比妥钠 (1.0-2.0 mL/kg) 腹腔注射麻醉, 大鼠眼内眦静脉丛采血, 用全自动血液分析仪测定外周血白细胞计数、中性粒细胞绝对值、血红蛋白和血小板水平。

1.5.3 外周血 T 淋巴细胞亚群及 CTLA-4、PD-1 表达 抽取腹主动脉血置于肝素抗凝管中, 取 100 μ L 样本, 分别加入适量的 CD3、CD4、CD8、PD-1、CD152 荧光抗体染色, 混匀充分后避光孵育 30 min, 用红细胞裂解液裂解 20 min, PBS 冲洗, 300 \times g 离心 5 min 后弃上清液, 再次 PBS 洗涤, 300 \times g 离心 5 min 后弃上清液, 用 500 μ L PBS 重悬沉淀, 通过流式细胞仪检测各亚类细胞占淋巴细胞

百分比和 CTLA-4、PD-1 的表达率。用 FlowJo 10 软件进行结果分析。

1.5.4 骨髓组织造血变化 采血后用颈椎脱臼法迅速处死大鼠, 取股骨骨髓组织, 组织固定液固定 24 h 后, 骨髓脱钙液脱钙, 石蜡包埋、切片, 瑞氏苏木精-伊红染色, 显微镜下观察骨髓增生程度。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 26.0 软件进行数据处理与统计分析, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据比较方差齐性采用单因素方差分析, 方差不齐采用韦尔奇检验; 组间两两数据比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐采用邓尼特 T3 检验。非正态分布以 $M(P_{75}-P_{25})$ 表示, 采用非参数秩和检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过广州医科大学附属中医医院李子元专家审核。

2 结果 Results

2.1 活髓方对骨髓增生异常综合征模型大鼠临床体征的影响 第 2 次尾静脉注射二甲基苯葱后, 与正常对照组相比, 模型组大鼠逐渐精神萎靡, 活动减少, 被毛凌乱, 四肢末端、眼球苍白, 大便稀烂, 第 3 次尾静脉注射二甲基苯葱后出现体质量下降。与模型组相比, 西药组和活髓方低、高剂量组大鼠的精神及活动状态均有改善, 体质量缓慢增加。实验过程中, 除正常对照组外, 其余各组大鼠均有死亡: 模型组死亡 5 只, 西药组死亡 3 只, 活髓方高剂量组死亡 3 只, 活髓方低剂量组死亡 4 只。

2.2 活髓方对骨髓增生异常综合征模型大鼠外周血细胞的影响 与正常对照组相比, 模型组大鼠外周血白细胞计数、中性粒细胞绝对值、血红蛋白、血小板显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 西药组外周血白细胞计数、中性粒细胞绝对值、血红蛋白和血小板显著升高 ($P < 0.05$); 活髓方高剂量组外周血白细胞计数、中性粒细胞绝对值、血红蛋白显著升高 ($P < 0.05$), 血小板有升高趋势, 但无统计学意义 ($P > 0.05$); 活髓方低剂量组外周血中性粒细胞绝对值、血红蛋白显著升高 ($P < 0.05$), 白细胞计数、血小板有升高趋势, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。西药组与活髓方高剂量组呈现出相似的疗效 ($P > 0.05$), 活髓方高、低剂量组血红蛋白呈剂量依赖性 ($P < 0.05$), 活髓方高剂量组白细胞计数和血小板水平均高于活髓方低剂量组, 但无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。结果表明活髓方能改善骨髓增生异常综合征模型大鼠的外周血象。

2.3 活髓方对骨髓增生异常综合征模型大鼠骨髓造血的影响 各组大鼠活检例数及骨髓增生程度见图 1、表 2。瑞氏染色后, 显微镜下可见正常对照组大鼠骨髓有核细胞增生活跃或明显活跃, 各组疗效无显著性差异 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 西药组及活髓方高剂量组造血面积相对增加。

表 1 | 活髓方对骨髓增生异常综合征大鼠外周血细胞的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 | Effect of Huosui Formula on peripheral blood cells in rats with myelodysplastic syndrome

组别	剂量	n	白细胞计数 ($\times 10^9 L^{-1}$)	中性粒细胞绝对 对值 ($\times 10^9 L^{-1}$)	血红蛋白 (g/L)	血小板 ($\times 10^9 L^{-1}$)
正常对照组	-	10	5.49±1.09	1.23±0.27	168.50±13.03	681.10±178.07
模型组	-	10	2.36±1.17 ^a	0.12±0.09 ^a	103.20±13.12 ^a	267.20±117.02 ^a
西药组	沙利度胺 10 mg/kg, 维 A 酸 4 mg/kg	12	4.65±1.22 ^b	0.61±0.45 ^b	140.83±15.46 ^b	442.58±87.33 ^b
活髓方高剂量组	活髓方 6 g/kg	12	3.84±1.03 ^b	0.54±0.43 ^b	135.25±12.57 ^b	387.42±146.20
活髓方低剂量组	活髓方 1.5 g/kg	11	2.99±0.99	0.58±0.29 ^b	122.27±14.14 ^b	341.73±142.92

表注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。采用韦尔奇检验及邓尼特 T3 检验。“-”为未用药。

表 2 | 活髓方对骨髓增生异常综合征大鼠骨髓造血的影响 (n)

组别	剂量	n	活跃	明显活跃	极度活跃
正常对照组	-	10	7	3	0
模型组	-	7	3	4	0
西药组	沙利度胺 10mg/kg, 维 A 酸 4 mg/kg	9	3	5	1
活髓方高剂量组	活髓方 6 g/kg	10	4	5	1
活髓方低剂量组	活髓方 1.5 g/kg	7	3	3	1

表注: “-”为未用药。

2.4 活髓方对骨髓增生异常综合征模型大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响 与正常对照组相比, 模型组大鼠外周血 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 表达显著降低, CD8⁺ 表达显著增高 ($P < 0.05$), 提示造模后大鼠 T 细胞免疫下降。与模型组比较, 活髓方高剂量组与西药组显示出相似的疗效, 外周血 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 表达显著升高, CD8⁺ 表达显著降低 ($P < 0.05$); 活髓方低剂量组 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 表达有升高趋势, CD8⁺ 表达有下降趋势, 但无统计学差异 ($P > 0.05$)。结果表明活髓方能改善骨髓增生异常综合征模型大鼠的 T 细胞免疫, 提升 CD4⁺T 细胞表达水平, 上调 CD4⁺/CD8⁺ 比例, 降低 CD8⁺T 细胞表达水平, 促进 T 细胞活化, 见表 3, 图 2。

表 3 | 活髓方对骨髓增生异常综合征大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 | Effect of Huosui Formula on peripheral blood T lymphocyte subsets in rats with myelodysplastic syndrome

组别	剂量	n	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常对照组	-	10	60.40±4.31	35.59±4.15	1.73±0.30
模型组	-	10	50.71±3.18 ^a	43.14±4.72 ^a	1.20±0.21 ^a
西药组	沙利度胺 10mg/kg, 维 A 酸 4 mg/kg	12	57.72±3.13 ^b	36.98±3.31 ^b	1.58±0.21 ^b
活髓方高剂量组	活髓方 6 g/kg	12	54.68±5.00 ^b	38.46±5.13 ^b	1.46±0.30 ^b
活髓方低剂量组	活髓方 1.5 g/kg	11	53.51±3.46	39.26±5.20	1.39±0.26

表注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。采用单因素方差分析。“-”为未用药。

2.5 活髓方对骨髓增生异常综合征模型大鼠外周血 CTLA-4、PD-1 的影响 与正常对照组比较, 模型组大鼠外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞的 PD-1 和 CTLA-4 表达水平显著增加 ($P < 0.05$)。CTLA-4 在 T 细胞表面鲜有表达。与模型组比较, 各药物处理组 CD4⁺CTLA-4⁺、CD4⁺PD-1⁺、CD8⁺CTLA-4⁺、CD8⁺PD-1⁺ 的表达均有下调, 除西药组 CD8⁺CTLA-4⁺ 外, 其余指标无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 4, 图 3。

表 4 | 活髓方对骨髓增生异常综合征模型大鼠外周血 CTLA-4、PD-1 的影响

Table 4 | Effect of Huosui Formula on CTLA-4 and PD-1 in peripheral blood in rats with myelodysplastic syndrome

组别	剂量	n	CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	CD4 ⁺ PD-1 ⁺	CD8 ⁺ CTLA-4 ⁺	CD8 ⁺ PD-1 ⁺
正常对照组	-	10	0.00(0.10)	1.31±0.23	0.00(0.10)	0.16±0.04
模型组	-	10	0.47±0.14 ^a	5.08±0.95 ^a	0.74±0.21 ^a	2.70(6.73) ^a
西药组	沙利度胺 10 mg/kg, 维 A 酸 4 mg/kg	12	0.10(0.20)	2.96±0.22	0.00(0.10) ^b	0.10(0.48)
活髓方高剂量组	活髓方 6 g/kg	12	0.10(0.08)	2.42±0.28	0.10(0.20)	0.40±0.08
活髓方低剂量组	活髓方 1.5 g/kg	11	0.11±0.03	2.40±0.39	0.19±0.03	0.38±0.11

表注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。正态分布采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 非正态分布采用 $M(P_{75}-P_{25})$ 表示, 组间分析采用非参数秩和检验。CTLA-4: 细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4; PD-1: 程序性死亡受体 1。“-”为未用药。

3 讨论 Discussion

祖国医学虽未明确记载骨髓增生异常综合征这一病名, 但根据其面色苍白、怠倦乏力、发热、出血等临床表现, 可归类为中医“虚劳”“血证”等范畴。2008 年“常见血液病中医命名规范化研讨会”上解读骨髓增生异常综合征为“髓毒劳”, 其中“髓”指病位, “毒”“劳”则描述了病机和病性^[9]。基于传统中医理论, 该研究结合国家级名中医陈志雄、陈信义、唐旭东、周永明教授等血液疾病研究者对此病病机的深入探讨^[7, 10-12], 认为脾肾乃先后天之本, 脾肾虚损是骨髓增生异常综合征患者气血生化乏源、髓海不足、造血紊乱的根本原因, 且贯穿于发病始终, 同时痰瘀邪毒不仅是骨髓增生异常综合征发病的病理产物, 其久留内犯骨髓也是致病因素之一。鉴于此病的病机特点, 治疗策略应综合考虑标本虚实, 采取健脾补肾生髓、活血化瘀解毒并举的方法^[13]。

中医药在治疗骨髓增生异常综合征方面已展现出治疗潜力。既往临床应用陈志雄教授经验补肾解毒法组方(党参、白术、茯苓、菟丝子、黄精、半枝莲、白花蛇舌草、三七等)治疗骨髓增生异常综合征, 总体反应率达 78.57%^[6]。此外, 验方十星丹(人参、鹿角霜等, 拟温肾解毒为主)联合西药、常规支持治疗 18 例中低危骨髓增生异常综合征患者, 外周血白细胞、血红蛋白及病态造血较治疗前改善, 输血依赖或输血次数较治疗前减少, 总缓解率为 66.7%, 总反应率达 88.9%, 无效仅 2 例, 临

床效果良好，毒副作用不明显且耐受性好^[7]。基于以上临床观察，该研究组方由十星丹化裁而来的活髓方，着重于补肾活血解毒，遣人参、鹿茸健脾补肾、补益气血、填精益髓，联合莪术、青黛等以解毒祛瘀生新，诸药合用共奏补肾益髓、解毒化瘀之功，故名“活髓”。肾主骨生髓，肾气充则髓有生发之源，源源而生；后天之脾滋养先天肾气，亦可助生髓化血；而瘀血不去、新血不生，当以活血化瘀之药味改善骨髓造血微环境、促进造血。活髓方主要成分之一人参已被证实具有多种药理作用，其提取物及活性成分人参皂苷能够通过抑制细胞凋亡保护骨髓造血功能^[14]，此外还显示增强免疫功能和调节肿瘤免疫原性的能力^[15-16]；其他成分如鹿茸、莪术、青黛等亦具有调节免疫、抗肿瘤等多种药理活性^[17-21]。

此外，动物实验研究证实，中药复方益髓理血饮（含熟地黄、天冬、人参、淫羊藿、黄芪等）对二甲基苯蒽诱导的骨髓增生异常综合征模型大鼠具有显著疗效，能够通过调节 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达减少骨髓细胞凋亡^[22]，改善骨髓增生和病态造血，并通过调节白细胞介素 3 和肿瘤坏死因子 α 水平优化免疫微环境，降低原始细胞比例^[23]。王志晓等^[24]研究的回生胶囊通过改善骨髓增生异常综合征模型大鼠的病态造血和调节 T 淋巴细胞水平，减少肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 释放，展现抗肿瘤效果。贾新颜等^[25]的临床研究显示，三子补血汤（枸杞子、菟丝子、女贞子、黄芪、当归、仙鹤草、茜草等）联合阿扎胞苷可调节骨髓增生异常综合征患者 Treg/Th17 细胞比例及 Foxp3/ROR γ t 水平，促进造血细胞增殖和免疫系统改善。董萍萍等^[4]发现健脾补肾解毒方可改善骨髓增生异常综合征患者辅助性 T 细胞 / 抑制 T 细胞比例倒置，增强免疫功能。中国中医科学院西苑医院长期应用青黄散为主的复方治疗骨髓增生异常综合征，总有效率达 69.40%–93.84%，不良反应发生率低，基础研究发现其疗效机制涉及细胞凋亡、表观遗传调控和 HIF1A/GATA 信号通路促进红系分化^[26-27]。尽管这些研究为中医药治疗骨髓增生异常综合征提供了有力的实验和临床支持，但目前该领域的实验验证仍然有限，免疫调节机制的研究仍需进一步深化。

免疫失调是骨髓增生异常综合征的一个标志性特征。骨髓增生异常综合征微环境中免疫功能受损使肿瘤细胞免疫逃逸，促使疾病的发生和维持。在骨髓增生异常综合征进展过程中，T 细胞的改变会诱导自身免疫、细胞因子异常释放、免疫监视减弱或丧失，从而导致恶性克隆增殖^[28-30]，其中免疫检查点（如 PD1/PD-L1、CTLA-4 等）的失调是免疫逃避的关键机制。真实世界中，PD-1/PD-L1 和 CTLA-4 均在骨髓增生异常综合征患者中过表达，导致骨髓微环境转变为免疫抑制状态，促进骨髓增生异常

综合征细胞克隆演化及免疫逃逸^[31-33]，此时可通过阻断 CTLA-4 和 PD-1 信号通路来恢复 T 细胞的耗竭从而发挥抗肿瘤效应^[34]。CTLA-4 和 PD-1/PD-L1 抑制剂已经证明在骨髓增生异常综合征中具有可能的临床益处，在联合去甲基化药物或在去甲基化药物耐药患者中显示出了令人鼓舞的效果，甚至客观缓解率可达 70% 以上^[35-37]。但 ZEIDAN 等^[38]开展的一项 2 期临床试验发现，联合用药并没有比单用阿扎胞苷表现出更好的临床疗效。而另一项研究使用多重免疫荧光 (mIF) 的多光谱成像来分析骨髓活检切片发现^[39]，与正常对照相比，新发骨髓增生异常综合征患者 CD8⁺ T 细胞、CD8⁺PD1⁺ T 细胞增加，但 CD8⁺CTLA4⁺ T 细胞减少；与低风险组相比，高危组 CD8⁺ T 细胞和 CD8⁺PD1⁺ T 细胞增加，CD8⁺CTLA4⁺ T 细胞减少，CTLA4 可能不是干扰骨髓增生异常综合征免疫微环境的主要分子。此与 COATS 等^[40]的结果相似，可能 CTLA-4 表达水平的增加是疾病进展至后期的一个关键步骤^[32]。然而，需要更多的研究来确定免疫检查点的机制模式、与疾病进展的关系以及临床指导治疗策略。

该研究在中医药调控免疫检查点治疗实体瘤有效的背景下^[41]，使用中药复方活髓方对骨髓增生异常综合征模型大鼠进行干预，研究内容包括评估大鼠外周血细胞计数、骨髓增生程度及 T 淋巴细胞比例，还首次探索了中药复方对骨髓增生异常综合征模型免疫检查点分子表达的影响。根据冯宝章等^[8, 23]造模方法，研究结果显示，二甲基苯蒽诱导建立的骨髓增生异常综合征模型大鼠外周血全血细胞减少，T 淋巴细胞比例下降，PD-1 和 CTLA-4 表达水平增加。活髓方治疗后，骨髓增生异常综合征模型大鼠的外周血细胞计数，尤其血红蛋白浓度提升，骨髓增生和造血功能得到增强。与黄玉静、夏小军等^[22-24]研究认为造血改善产生积极影响相一致。同时研究发现活髓方能改善骨髓增生异常综合征模型大鼠的 T 细胞免疫，提升 CD4⁺T 细胞水平，上调 CD4⁺/CD8⁺ 比例，促进 T 细胞活化。活髓方高剂量和低剂量组大鼠外周血 CTLA4 和 PD-1 总体表达有降低趋势，无统计学差异，结果表明活髓方可能通过下调 PD-1、CTLA-4 的表达，促进 T 细胞活化，进而达到抗肿瘤和促进造血的疗效。这一研究扩展了中医药对骨髓增生异常综合征在免疫检查点调控方面的潜在应用，为深入探索中医药在治疗骨髓增生异常综合征等血液疾病中的潜力提供了重要的实验依据。

研究的局限性：第一，研究可能未能深入探讨活髓方作用的具体分子机制和信号通路，未能全面评估活髓方对大鼠整体免疫状态的影响，包括细胞因子水平、免疫细胞活性等，可进一步深入研究；第二，2024 年世界卫生组织将这些疾病重新命名为“骨髓增生异常肿瘤”，国际

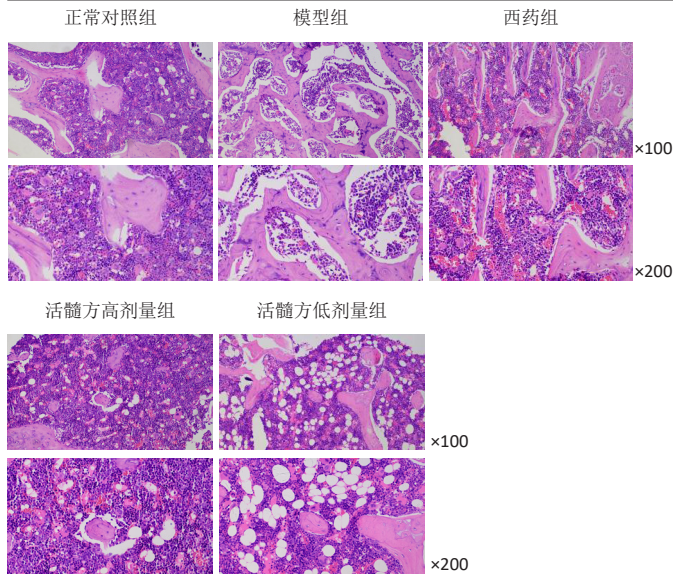


图1 | 活髓方对骨髓增生异常综合征大鼠骨髓造血的影响
Figure 1 | Effect of Huosui Formula on bone marrow hematopoiesis in rats with myelodysplastic syndrome

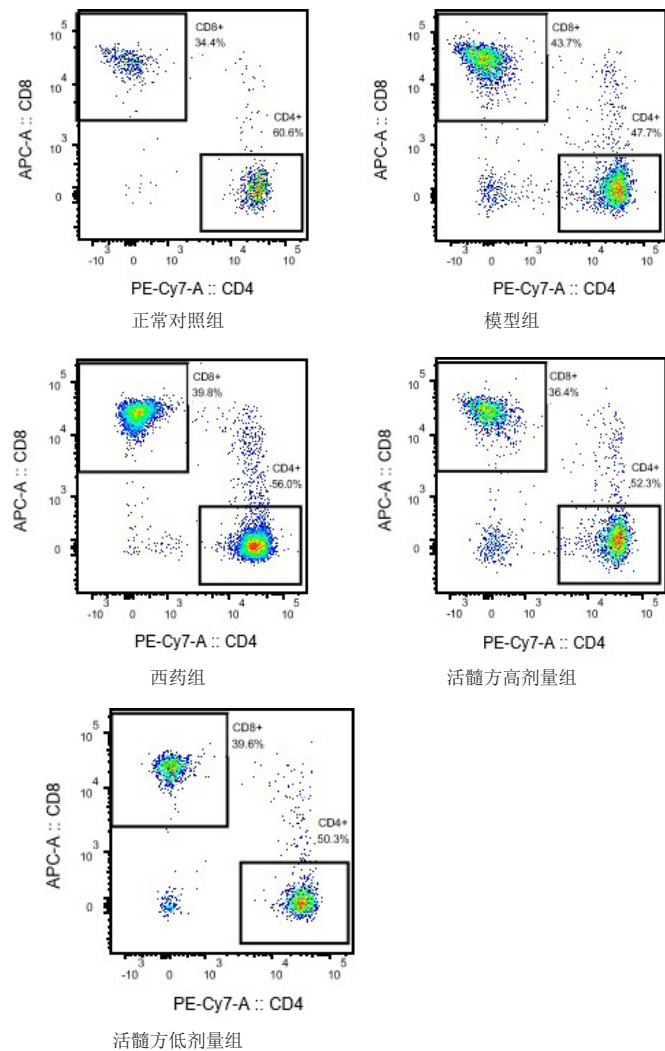


图2 | 活髓方对骨髓增生异常综合征大鼠外周血T淋巴细胞亚群的影响 (流式图)
Figure 2 | Effect of Huosui Formula on peripheral blood T lymphocyte subsets in rats with myelodysplastic syndrome (flow cytometry)

共识分类 ICC 则保留了病名“骨髓增生异常综合征”，其预后、治疗愈来愈重视相关的细胞遗传学和分子学特征，而骨髓原始细胞计数、发育异常程度仍受认可，针对此研究采用二甲基苯蒽诱导建立的骨髓增生异常综合征模型会存有一定争议，但此模型在医学研究中被广泛应用，以探讨骨髓增生异常综合征的发病及治疗策略等相关研究，可观察到病态造血、外周血细胞减少、T淋巴细胞水平变化等，与临床骨髓增生异常综合征患者有相似变化。房莹等^[42]研究认为基因工程小鼠模型通常局限于研究特定关键基因对肿瘤发生发展的关系，不能完全代表肿瘤的原始特性、基因表型多样性和复杂性。今后寻找中医药治疗机制的研究新思路也可从其他角度构建骨髓增生异常综合征模型，探讨中医药克服分子遗传表型的相关问题。

致谢：感谢北京东直门医院陈信义教授、郎海燕教授的指导，感谢广州中医药大学李树源博士、暨南大学李泊研究员研究团队的协作。

作者贡献：戴嫩、卓秋燕负责实验实施、数据分析和论文撰写，夏思负责指标检测和数据分析，蒋群、卢诗颖负责指标检测和数据校对；刘燕娣负责骨髓病理技术，戴嫩负责实验设计、数据和文章的校对。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

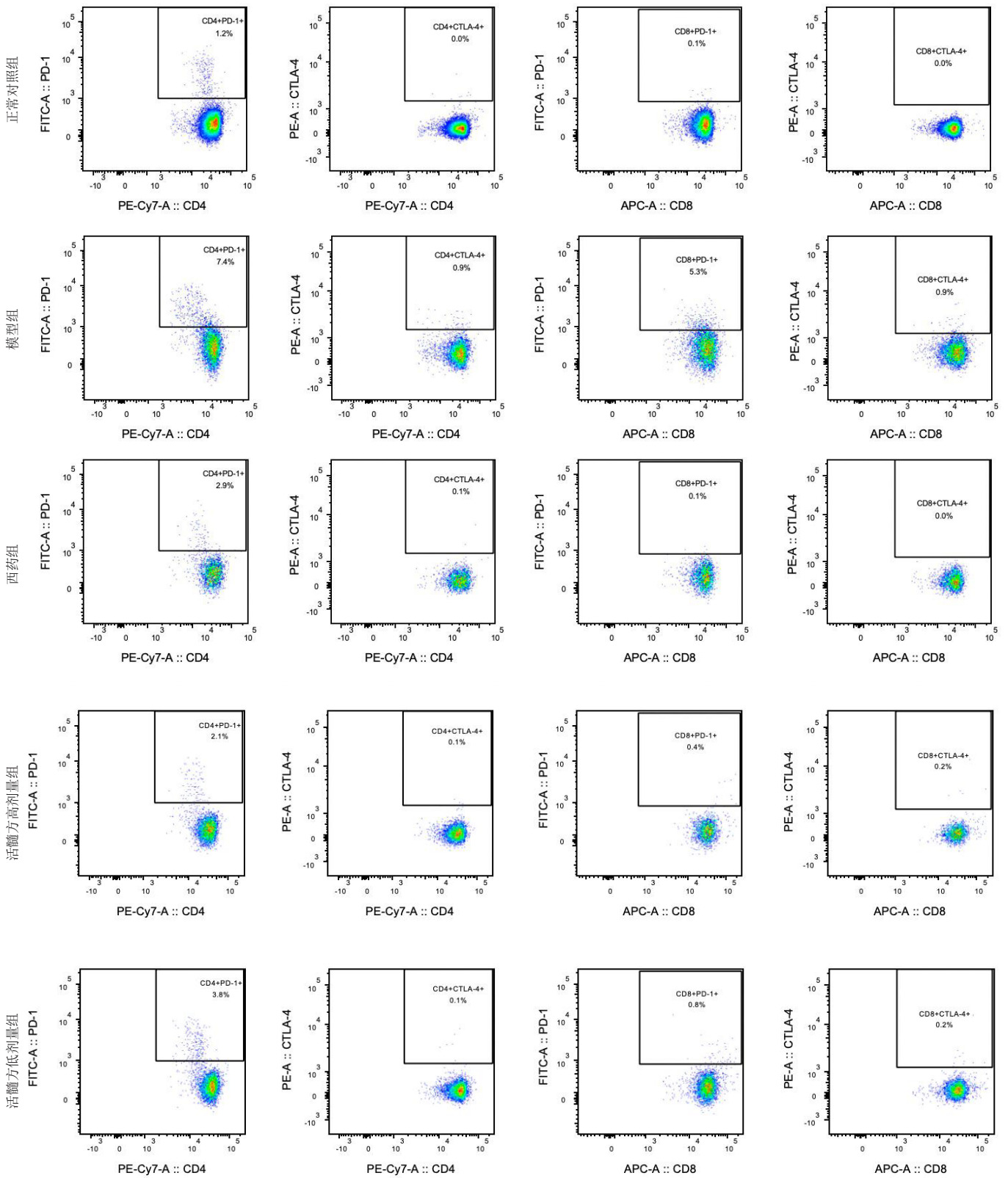
开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] GARCIA-MANERO G. Myelodysplastic syndromes: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2023; 98(8):1307-1325.
- [2] FRUMM SM, SHIMONY S, STONE RM, et al. Why do we not have more drugs approved for MDS? A critical viewpoint on novel drug development in MDS. *Blood Rev.* 2023;60:101056.
- [3] BODDU P, KANTARJIAN H, GARCIA-MANERO G, et al. The emerging role of immune checkpoint based approaches in AML and MDS. *Leuk Lymphoma.* 2018;59(4):790-802.
- [4] 董萍萍, 周永明. 健脾补肾解毒方调节骨髓增生异常综合征T淋巴细胞亚群的疗效观察 [J]. *四川中医*, 2021,39(2):59-62.
- [5] 杨剑, 孟咸中, 朱红青, 等. 补肾解毒方联合阿扎胞苷治疗骨髓增生异常综合征疗效分析及对血常规指标的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2023,22(11):1148-1152.
- [6] 戴嫩, 于天启. 补虚解毒法干预骨髓增生异常综合征的观察 [J]. *广州医药*, 2013,44(6):14-17.



图注：CTLA-4 为细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4；PD-1 为程序性死亡受体 1。

图 3 | 活髓方对骨髓增生异常综合征大鼠外周血 CTLA-4、PD-1 的影响 (流式图)

Figure 3 | Effect of Huosui Formula on peripheral blood CTLA-4 and PD-1 in rats with myelodysplastic syndrome (flow cytometry)

- [7] 戴嫩, 陈志雄, 于天启. 十星丹联合西药治疗中低危骨髓增生异常综合征的临床观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(5):633-636.
- [8] 冯宝章, 赵堂富, 王素钦, 等. 骨髓增生异常综合征大鼠模型的建立及其鉴定 [J]. 实验血液学杂志, 1996(3):309-313.
- [9] 陈信义, 麻柔, 李冬云. 规范常见血液病中医病名建议 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(11):1040-1041.
- [10] 丁皓, 贾梦冉, 张稚淳, 等. 陈信义教授“调平”思想论治 MDS 经验 [J]. 现代中医临床, 2020, 27(1):63-65+70.
- [11] 刘青果, 张盛琪, 高琰, 等. 基于“解毒化痰、脾肾同治”理论辨治骨髓增生异常综合征经验 [J]. 北京中医药, 2022, 41(12):1417-1419.
- [12] 汪凯, 李昌桂, 周永明. 基于骨髓微环境从脾肾论治骨髓增生异常综合征 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(11):2725-2728.
- [13] 毛悦, 靳楠, 唐旭东. 基于中医传承计算平台对中医药治疗骨髓增生异常综合征的用药规律研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(6):1114-1118+1190.
- [14] ZHANG H, SUN Y, FAN M, et al. Prevention effect of total ginsenosides and ginseng extract from Panax ginseng on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Phytother Res.* 2023;37(8):3583-3601.
- [15] YOU L, CHA S, KIM MY, et al. Ginsenosides are active ingredients in Panax ginseng with immunomodulatory properties from cellular to organismal levels. *J Ginseng Res.* 2022;46(6):711-721.
- [16] XIAODAN S, YING C. Role of ginsenoside Rh2 in tumor therapy and tumor microenvironment immunomodulation. *Biomed Pharmacother.* 2022;156:113912.
- [17] LI M, LI Q, DONG H, et al. Pilose antler polypeptides enhance chemotherapy effects in triple-negative breast cancer by activating the adaptive immune system. *Int J Biol Macromol.* 2022;222(Pt B):2628-2638.
- [18] 王清泉, 宋景, 王雨晴, 等. 鹿茸肽的提取纯化、药理作用、载体应用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(5):137-146+286.
- [19] HOU Z, FANG G. Research Progress of Anti-tumor Effects of Curcuma zedoaria and its Active Ingredients Through Immune Regulation Mechanism. *J Clin Nurs Res.* 2021;5(4):1-7.
- [20] 华天琦, 刘宇灵, 林龙飞, 等. 莜术油化学成分、抗肿瘤作用及制剂研究进展 [J]. 中国药房, 2024, 35(11):1396-1402.
- [21] 高凤洋, 张大方, 李超英. 中药青黛炮制及药理作用的研究进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2020, 36(1):180-183+188.
- [22] 黄玉静, 熊德上, 徐西华, 等. 益髓理血饮减少二甲基苯蒽诱导的骨髓增生异常综合征大鼠骨髓细胞凋亡 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2017, 42(1):26-34.
- [23] 黄玉静, 熊德上, 徐西华, 等. 益髓理血饮对二甲基苯蒽诱导骨髓增生异常综合征模型大鼠骨髓病态造血的影响及机制 [J]. 中药材, 2016, 39(3):619-624.
- [24] 王志晓, 马骏, 赵文秀, 等. 回生胶囊对二甲基苯蒽诱导的骨髓增生异常综合征模型大鼠的影响 [J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(3):30-34.
- [25] 贾新颜, 陈晨, 唐剑飞, 等. 三子补血汤对骨髓增生异常综合征患者 Treg 及 Th17 细胞水平的影响 [J]. 中国当代医药, 2023, 30(31):41-45.
- [26] 王文儒, 丁宇斌, 唐旭东. 青黄散为主复方治疗骨髓增生异常综合征综述 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(6):2757-2761.
- [27] 范腾. 复方青黄散调控 HIF1A/GATA 信号通路改善骨髓增生异常综合征红系造血 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
- [28] RODRIGUEZ-SEVILLA JJ, COLLA S. T-cell dysfunctions in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2024;143(14):1329-1343.
- [29] 欧阳, 吴昊. 骨髓增生异常综合征免疫异常机制的研究新进展 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2021, 44(1):22-28.
- [30] ZHANG X, YANG X, MA L, et al. Immune dysregulation and potential targeted therapy in myelodysplastic syndrome. *Ther Adv Hematol.* 2023;14:20406207231183330.
- [31] SEIDEL JA, OTSUKA A, KABASHIMA K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol.* 2018;8:86.
- [32] AREF S, EL AGDAR M, EL SEBAIE A, et al. Prognostic Value of CD200 Expression and Soluble CTLA-4 Concentrations in Intermediate and High-Risk Myelodysplastic Syndrome Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020;21(8):2225-2230.
- [33] TCVETKOV NY, MOROZOVA E, EPIFANOVSKAYA OS, et al. Profile of Checkpoint Molecules Expression on Bone Marrow Cell Populations in Patients with High-Risk Myelodysplastic Syndrome. *Blood.* 2020;136:43-44.
- [34] 姜怡, 蔡雨晴, 刘苓霜. sCTLA-4 与恶性肿瘤关系的研究进展 [J]. 实用肿瘤杂志, 2019, 34(1):94-98.
- [35] CHIEN KS, KIM K, NOGUERAS-GONZALEZ GM, et al. Phase II study of azacitidine with pembrolizumab in patients with intermediate-1 or higher-risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2021;195(3):378-387.
- [36] RAVANDI F, ASSI R, DAVER N, et al. Idarubicin, cytarabine, and nivolumab in patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia or high-risk myelodysplastic syndrome: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Haematol.* 2019;6(9):e480-e488.
- [37] YANG X, MA L, ZHANG X, et al. Targeting PD-1/PD-L1 pathway in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol.* 2022;11(1):11.
- [38] ZEIDAN AM, BOSS I, BEACH CL, et al. A randomized phase 2 trial of azacitidine with or without durvalumab as first-line therapy for older patients with AML. *Blood Adv.* 2022;6(7):2219-2229.
- [39] HONG M, XIE Y, ZHAO J, et al. PD-1 Inhibitors Can be the First-Line Therapy for Myelodysplastic Syndrome (MDS)--Study on the Bone Marrow Immune Microenvironment of MDS By Multispectral Imaging of Multiplex Immunofluorescence. *Blood* 2022;140 (Supplement 1):12303-12304.
- [40] COATS T, SMITH A, MOURIKIS TP, et al. Mass Cytometry Reveals PD1 Upregulation Is an Early Step in MDS Disease Progression. *Blood.* 2016;128:4296-4296.
- [41] 张志鹏, 陈子琦, 田建辉. 中医药减毒增效作用在免疫检查点治疗中的应用进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2024, 29(3):339-347.
- [42] 房莹, 常春康. 骨髓增生异常综合征小鼠移植模型研究进展 [J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(4):344-347.

(责任编辑: NZH, ZN, QY, ZLJ)