

健脾益气摄血方对免疫性血小板减少症小鼠乏力症状的治疗作用及机制

南凌杉¹ 王 冲² 郎海燕² 潘一鸣² 马 薇² 王志刚² 魏 丢² 杨 璐² 韩丽珍²
陈信义²

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 北京中医药大学东直门医院血液科, 北京 100700)

【摘要】目的 探讨健脾益气摄血方对免疫性血小板减少症 (Immune thrombocytopenia, ITP) 小鼠的治疗作用及机制。**方法** 将 90 只 SPF 级 BALB/c 小鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、强的松组、健脾益气摄血组 (中剂量组、高剂量组), 每组 18 只。正常对照组经腹腔注射生理盐水 100 μ L/20 g, 其余各组经腹腔注射抗小鼠血小板血清 (APS) 100 μ L/20 g, 1 次/d, 建立 ITP 小鼠模型。造模第 8 天开始, 正常对照组、模型组给予 0.1 mL/10 g 生理盐水灌胃, 强的松组及健脾益气摄血中、高剂量组均予 0.1 mL/10 g 相应药物灌胃, 1 次/d, 共给药 8 d。Western blotting 法检测构成线粒体电子传递链复合物 II 的琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基 A (SDHA) 及调控线粒体蛋白质稳态的关键蛋白酶 ClpP、LonP1 蛋白表达, 荧光定量 PCR 法检测 SDHA、ClpP、LonP1 mRNA 表达。**结果** 模型组脾脏、心脏与脑组织 SDHA 蛋白表达高于正常对照组 ($P<0.05$), 强的松组、健脾益气摄血组脾脏 SDHA 蛋白表达低于模型组 ($P<0.05$); 模型组脾脏、心脏和骨骼肌 ClpP 蛋白表达均高于正常对照组 ($P<0.05$), 各治疗组脾脏 ClpP 表达均低于模型组 ($P<0.05$); 模型组脾脏组织 LonP1 表达低于正常对照组 ($P<0.05$), 强的松组脾脏组织 LonP1 表达高于模型组 ($P<0.05$), 而模型组心脏和骨骼肌 LonP1 表达均高于正常对照组 ($P<0.05$), 强的松组骨骼肌 LonP1 表达低于模型组 ($P<0.05$)。蛋白检测结果与相应组织的 mRNA 转录水平检测结果基本相符。**结论** 健脾益气摄血方可调节 ITP 小鼠线粒体功能, 从而改善乏力症状。

【关键词】 免疫性血小板减少症; 乏力; 健脾益气摄血方; 线粒体功能; 线粒体蛋白质稳态; 小鼠

DOI: 10.16025/j.1674-1307.2024.06.013

免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP) 是多重免疫机制参与的一种自身免疫性疾病, 主要临床表现为外周血小板破坏增多、骨髓血小板生成减少, 不同程度的皮肤、黏膜及内脏出血^[1]。健脾益气摄血方以四君子汤为基础, 增加黄芪、阿胶、茜草以固气止血, 有健脾益气、养血止血功效, 能提升血小板数量、改善出血。线粒体作为调控细胞能量代谢、生物合成及细胞衰亡的重要细胞器, 能够为细胞进行各种生命活动提供能量支持, 而其功能异常对多种疾病和病理状态的发生和发展起重要作用。课题组在前期研究基础上, 采用被动免疫造模法成功复制了 ITP 动物模型, 给予健脾益气摄血方进行干预, 并选择构成线粒体电子传递链复合物 II 的

琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基 A (SDHA) 及调控线粒体蛋白质稳态的关键蛋白酶 ClpP 和 LonP1 为观察指标, 探索健脾益气摄血方对 ITP 小鼠乏力症状的治疗作用及其分子机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 120 只 (编号: D12, 体重 18~22 g, 2 月龄, 雌雄各半), 购于第四军医大学实验动物中心, 许可证号: SCXK (陕) 2014-002, 于 SPF 级实验室 IVC 鼠笼中饲养。豚鼠 24 只, 体重 250 g, 雌雄各半, 购于兴平市天瑞实验动物养殖厂, 许可证号: SCXK (陕) 2012-001, 普通环境饲养。以普通饲料饲养, 自由进食、饮水, 饲养环境温度 21~26 $^{\circ}$ C, 湿度 50%~

基金项目: 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目中医血液病学 (zyyzdxk—2023268); 国家自然科学基金青年基金项目 (81803904, 81703903)

作者简介: 南凌杉, 女, 27 岁, 博士研究生。研究方向: 中医药防治血液、肿瘤疾病。

通信作者: 郎海燕, E-mail: julietlang@126.com

引用格式: 南凌杉, 王冲, 郎海燕, 等. 健脾益气摄血方对免疫性血小板减少症小鼠乏力症状的治疗作用及机制[J]. 北京中医药, 2024, 43(6): 636-644.

60%。均适应性饲养 7 d。动物实验操作参考科技部关于善待实验动物的指导性意见,符合有关实验动物的伦理学要求,实验动物方案经西安医学院药学院伦理委员会许可(伦理审批号:XYLS2019069)。

1.2 实验药物

健脾益气摄血方,药物组成:黄芪 20 g,党参 15 g,茯苓 15 g,白术 10 g,阿胶 15 g,茜草 10 g,炙甘草 6 g。由西安星华药物研究所提供,并按照中药新药制备工艺标准制备,中剂量浓度 1 mL 药液含生药 1.17 g,高剂量浓度为中剂量浓度 2 倍。强的松购于上海晶纯生化科技股份有限公司,按照 2 mg/mL 浓度配制强的松水溶液。

1.3 实验试剂与仪器

HiScript[®] II QRT SuperMix for qPCR 试剂盒 (Vazyme 公司,中国);溴酚蓝,BSA,SDS (Solarbio 公司,中国);Protease inhibitor cocktail tablet (Roche 公司,中国);Tris 和 Glycine (Ameresco 公司,中国);Tween-20 和 TritonX-100 [生工生物工程(上海)股份有限公司]; β -巯基乙醇,蛋白 marker 标准品,30% Acr-Bia (29:1) (Bio-Rad 公司,美国);TEMED (Sigma 公司,美国);硝酸纤维素膜 (Life 公司,美国);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所,中国);兔 SDHA 单克隆抗体、兔 ClpP 多克隆抗体、鼠 LonP1 单克隆抗体、鼠 GAPDH 单克隆抗体、鼠 β -Actin 多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,中国);ECL Western Blotting Substrate (Thermo 公司,美国)。

全自动波长酶标仪 (Bio-Tek ELX800, 美国);台式高速匀浆机 (POLYTRON 公司,美国);赛默飞冰冻切片机 (Thermo Fisher Scientific, 美国);Mini 离心机、小型高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司,美国);微量高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,中国);X 射线摄影暗匣、洗片机 (柯达公司,日本);扫描仪 (佳能公司,日本)。

2 实验方法

2.1 抗小鼠血小板血清制备

按照经典被动免疫造模法制备抗小鼠血小板血清。步骤如下: BALB/c 小鼠麻醉取抗凝全血,梯度离心 (1 100 r/min 10 min; 3 000 r/min 10 min)

后得到血小板。将血小板用 PBS 洗涤 2 次,重悬,调整浓度至 $2.5 \times 10^9/L$,将洗涤后的血小板分别与等量完全福氏佐剂和不完全福氏佐剂混匀作抗原。其中,以含完全福氏佐剂抗原于 0 周注射于豚鼠足掌、背及皮下,共 5 点,合计 1 mL;以含不完全福氏佐剂抗原分别于 1、2、4 周按上述相同部位与点数注射。第 5 周从豚鼠心脏取不抗凝全血,离心分离血清,即得豚鼠抗小鼠血小板血清 (GP-APS)。56 °C 灭活补体,红细胞吸附,用生理盐水按 1:4 稀释 APS 备用。

2.2 动物分组与 ITP 模型制备

取 90 只雌雄各半小鼠,尾静脉断尾取血,全自动动物血液分析仪检测 PLT,按随机数字表法分为正常对照组、模型组、强的松组、健脾益气摄血组 (中剂量组、高剂量组),每组 18 只。正常对照组经腹腔注射生理盐水,其余各组均经腹腔注射抗小鼠血小板血清 (APS),各 100 μ L/20 g,1 次/d,重复至实验结束。

2.3 给药方法

造模第 8 天开始,正常对照组、模型组给予生理盐水灌胃,强的松组及健脾益气摄血中、高剂量组予相应药物灌胃,均予 0.1 mL/10 g,1 次/d,共给药 8 d。

2.4 观察指标与方法

给药结束后,处死小鼠,取脾、肝、心、肺、结肠、脑和骨骼肌组织,-80 °C 冻存备用。

2.4.1 Western blotting 法检测 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白表达:前期临床研究表明健脾益气摄血高剂量组疗效最佳^[10],故选用高剂量健脾益气摄血方作为干预药物,并在后续结果及讨论中将该组命名为健脾益气摄血组。提取总蛋白:从 80 °C 环境中取出以上各组动物组织样本约 100 mg,加入 400 μ L 蛋白质裂解液,将组织研磨破碎至无肉眼可见固体成分,冰上放置裂解,13 000 r/min 4 °C 离心 20 min,吸取上清液。对蛋白进行 BCA 定量、电泳分离。转 PVDF 膜后室温条件下封闭 2 h,最后再分别加 (SDHA 1:2 000, ClpP 1:1 000, LonP1 1:1 000, GAPDH 1:30 000, β -Actin 1:10 000) 一抗 4 °C 孵育过夜,加入二抗 (1:1 000),37 °C 孵育 1 h。ECL 试剂显影,使用 Image J 软件分析各个蛋白条带灰度值,以 β -Actin 和 GAPDH 为内参,计算蛋白水平。

2.4.2 荧光定量 PCR 法 (qPCR) 检测 SDHA、

ClpP、LonP1 mRNA 表达: 用 Monzol 试剂提取各组细胞的总 RNA。以 RNA 为模板反转录为 cDNA 后, 使用 qPCR 技术 (反应体系 SYBR GREEN 10 μ L, 上游/下游引物 0.4 μ L, ddH₂O 7.2 μ L, cDNA 2 μ L) 检测各组细胞中 ClpP、SDHA 和 LonP1 的 mRNA 水平。以 GAPDH 为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达。引物序列见表 1。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析。符合

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度 (bp)
GAPDH	Forward: 5'-GTCATCCCAGAGCTGAACGG-3'	107
	Reverse: 5'-TACTTGGCAGGTTTCTCCAGG-3'	
ClpP	Forward: 5'-CCATAGTGGTGGAGCAGACG-3'	138
	Reverse: 5'-AGAACAACAGCTGGGCAATG-3'	
SDHA	Forward: 5'-ACACTGGAGGAAGCACACC-3'	134
	Reverse: 5'-AGTAGGAGCGGATAGCAGGA-3'	
LonP1	Forward: 5'-AGAACTTGGACTTGGCTCGG-3'	103
	Reverse: 5'-AGCTGGCTGACTGCAATGAA-3'	

正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组脾脏组织中 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白与基因表达比较

模型组脾脏组织中 SDHA、ClpP 蛋白表达较正常对照组高 ($P<0.05$), LonP1 蛋白表达较正常对照组低 ($P<0.05$); 强的松组与健脾益气摄血组脾脏组织中 SDHA、ClpP 蛋白表达较模型组低 ($P<0.05$), 强的松组脾脏组织中 LonP1 蛋白表达较模型组高 ($P<0.05$)。见图 1、表 2。

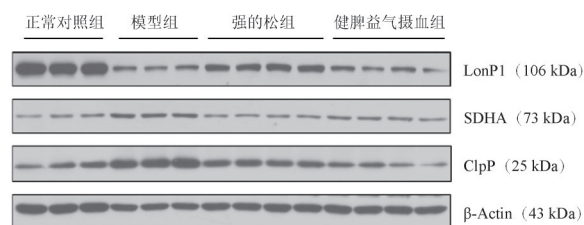


图 1 各组脾脏组织中 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白免疫印迹图

表 2 各组脾脏组织和心脏组织中 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	脾脏 SDHA 蛋白	脾脏 ClpP 蛋白	脾脏 LonP1 蛋白	心脏 SDHA 蛋白	心脏 ClpP 蛋白	心脏 LonP1 蛋白
正常对照组	18	0.46 $\pm$ 0.08	0.47 $\pm$ 0.12	0.92 $\pm$ 0.20	0.84 $\pm$ 0.01	0.77 $\pm$ 0.12	0.91 $\pm$ 0.05
模型组	18	1.33 $\pm$ 0.01*	1.45 $\pm$ 0.15*	0.22 $\pm$ 0.05*	1.02 $\pm$ 0.09*	0.89 $\pm$ 0.04*	1.07 $\pm$ 0.04*
强的松组	18	0.57 $\pm$ 0.02 Δ	0.61 $\pm$ 0.09 Δ	0.56 $\pm$ 0.06 Δ	1.03 $\pm$ 0.04	0.73 $\pm$ 0.08 Δ	1.07 $\pm$ 0.05
健脾益气摄血组	18	0.63 $\pm$ 0.08 Δ	0.41 $\pm$ 0.17 Δ	0.21 $\pm$ 0.05	1.11 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.09 $\Delta\blacktriangle$	1.10 $\pm$ 0.06
F 值		144.214	43.183	22.225	16.212	19.106	8.906
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

与正常对照组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$; 与强的松组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。

模型组脾脏组织中 SDHA、ClpP mRNA 表达较正常对照组高 ($P<0.05$), LonP1 mRNA 表达均较正常对照组低 ($P<0.05$)。强的松组与健脾益气摄血高剂量组脾脏组织中 SDHA、ClpP mRNA 表达较模型组低 ($P<0.05$), 健脾益气摄血中剂量组脾脏组织中 SDHA mRNA 表达较模型组低 ($P<0.05$), 而强的松组与健脾益气摄血中、高剂量组脾脏组织中 LonP1 mRNA 表达与模型组比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。健脾益气摄血高剂量组脾脏组织中 SDHA、LonP1 mRNA 表达高于强的松组 ($P<0.05$)。见表 3。

3.2 各组心脏组织中 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白与基因表达比较

模型组心脏组织中 SDHA、ClpP 与 LonP1 蛋白

表达均较正常对照组高 ($P<0.05$), 强的松组和健脾益气摄血组心脏组织中 ClpP 蛋白表达较模型组低 ($P<0.05$), 健脾益气摄血组心脏组织中 ClpP 蛋白表达较强的松组低 ($P<0.05$)。见图 2、表 2。

模型组心脏组织中 SDHA、LonP1 mRNA 表达较正常对照组高 ($P<0.05$)。健脾益气摄血中剂量组心脏组织中 SDHA、LonP1 mRNA 表达较模型组低 ($P<0.05$), 健脾益气摄血高剂量组心脏组织中 LonP1 mRNA 较模型组低 ($P<0.05$)。见表 3。

3.3 各组肝组织中 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白与基因表达比较

模型组肝组织中 ClpP 蛋白表达较正常对照组低 ($P<0.05$)。健脾益气摄血组肝组织中 SDHA、ClpP 和 LonP1 蛋白表达均较模型组低 ($P<0.05$),

表 3 各组脾脏组织和心脏组织中 SDHA、ClpP、LonP1 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	脾脏 SDHA	脾脏 ClpP	脾脏 LonP1	心脏 SDHA	心脏 ClpP	心脏 LonP1
正常对照组	18	1	1	1	1	1	1
模型组	18	1.74±0.02 [*]	1.32±0.18 [*]	0.67±0.08 [*]	1.52±0.13 [*]	1.16±0.10	1.51±0.08 [*]
强的松组	18	0.69±0.03 [△]	0.82±0.04 [△]	0.61±0.07	1.64±0.10	1.48±0.19	1.60±0.05
健脾益气摄血中剂量组	18	0.66±0.08 [△]	1.26±0.09	0.57±0.10	1.18±0.10 [△]	0.95±0.11	1.08±0.09 [△]
健脾益气摄血高剂量组	18	0.79±0.05 ^{△▲}	0.59±0.14 [△]	0.77±0.04 [▲]	1.48±0.07	1.05±0.13	1.24±0.04 [△]
<i>F</i> 值		285.882	22.482	19.11	26.126	8.998	139.808
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

与正常对照组比较, **P*<0.05; 与模型组比较, △*P*<0.05; 与强的松组比较, ▲*P*<0.05。

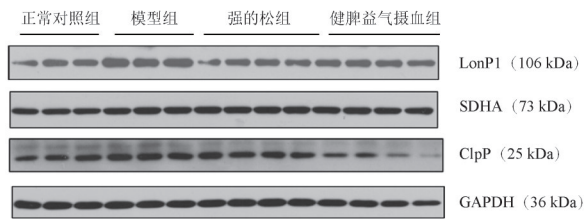


图 2 各组心脏组织中 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白免疫印迹图

强的松组肝组织中 ClpP 蛋白表达较模型组高 (*P*<

0.05)。见图 3、表 4。

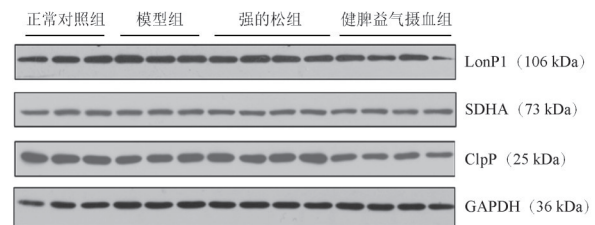


图 3 各组肝组织中 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白免疫印迹图

表 4 各组肝组织和结肠组织中 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	肝 SDHA 蛋白	肝 ClpP 蛋白	肝 LonP1 蛋白	结肠 SDHA 蛋白	结肠 ClpP 蛋白	结肠 LonP1 蛋白
正常对照组	18	0.90±0.16	0.84±0.80	1.18±0.21	0.48±0.04	0.47±0.06	0.82±0.09
模型组	18	1.07±0.05	0.83±0.07 [*]	0.99±0.06	0.53±0.06	0.62±0.19	0.71±0.04
强的松组	18	1.06±0.07	0.94±0.08 [△]	0.89±0.05	0.67±0.05 [△]	0.77±0.17	1.09±0.16 [△]
健脾益气摄血组	18	0.84±0.07 [△]	0.50±0.07 [△]	0.63±0.22 [△]	0.64±0.03 [△]	0.83±0.09	1.09±0.16 [△]
<i>F</i> 值		5.574	33.51	7.453	14.417	4.758	8.368
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

与正常对照组比较, **P*<0.05; 与模型组比较, △*P*<0.05。

模型组肝组织中 SDHA、ClpP 和 LonP1 mRNA 表达较正常对照组均高 (*P*<0.05); 强的松组与健

脾益气摄血高剂量组肝组织中上述指标表达较模型组均低 (*P*<0.05)。见表 5。

表 5 各组肝组织和结肠组织中 SDHA、ClpP、LonP1 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	肝 SDHA	肝 ClpP	肝 LonP1	结肠 SDHA	结肠 ClpP	结肠 LonP1
正常对照组	18	1	1	1	1	1	1
模型组	18	1.14±0.04 [*]	1.10±0.05 [*]	1.11±0.05 [*]	1.01±0.01	1.10±0.13	0.92±0.06
强的松组	18	0.76±0.08 [△]	0.96±0.03 [△]	0.87±0.03 [△]	1.00±0.07	0.90±0.07	0.85±0.08 [*]
健脾益气摄血中剂量组	18	1.17±0.02	1.12±0.04	1.13±0.10	0.95±0.01 [△]	0.82±0.12	0.76±0.08 [△]
健脾益气摄血高剂量组	18	0.82±0.01 [△]	0.91±0.03 [△]	0.86±0.03 [△]	0.89±0.11	0.84±0.13	0.83±0.04
<i>F</i> 值		56.241	22.376	18.282	2.264	3.849	7.794
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

与正常对照组比较, **P*<0.05; 与模型组比较, △*P*<0.05。

3.4 各组结肠组织中 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白与基因表达比较

模型组结肠组织中 SDHA、ClpP 和 LonP1 蛋白

表达与正常对照组比较差异均无统计学意义 (*P*>0.05)。强的松组与健脾益气摄血组结肠组织中 SDHA 和 LonP1 蛋白表达较模型组高 (*P*<0.05)。

见图 4、表 4。

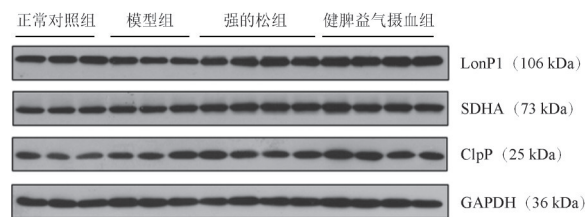


图 4 各组结肠 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白免疫印迹图

模型组结肠组织中 SDHA、ClpP 和 LonP1 mRNA 表达与正常对照组比较差异均无统计学 ($P>0.05$)。健脾益气摄血中剂量组结肠组织中 SDHA、LonP1 mRNA 表达均较模型组低 ($P<0.05$)。见表 5。

表 6 各组脑组织和肺组织中 SDHA、ClpP 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	脑 SDHA 蛋白	脑 ClpP 蛋白	肺 SDHA 蛋白	肺 LonP1 蛋白
正常对照组	18	0.89±0.09	0.95±0.13	1.07±0.03	0.80±0.07
模型组	18	1.14±0.10*	0.81±0.02	0.96±0.05*	0.74±0.03
强的松组	18	0.92±0.08 ^Δ	0.59±0.22	1.15±0.03 ^Δ	0.78±0.03
健脾益气摄血组	18	0.95±0.11	0.27±0.09 ^Δ	1.04±0.04 ^Δ	1.04±0.06 ^Δ
<i>F</i> 值		4.126	15.708	14.76	27.746
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

与正常对照组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

模型组脑组织中 SDHA mRNA 表达较正常对照组高 ($P<0.05$)，模型组脑组织中 LonP1 mRNA 表达水平较正常对照组低 ($P<0.05$)。强的松组和健

3.5 各组脑组织中 SDHA、ClpP、LonP1 蛋白与基因表达比较

本实验电泳 3 次均未观察到 LonP1 条带，故结果仅对脑组织中 SDHA、ClpP 蛋白条带进行相对定量分析。模型组脑组织中 SDHA 蛋白表达较正常对照组高 ($P<0.05$)，健脾益气摄血组脑组织中 ClpP 蛋白表达较模型组下调 ($P<0.05$)，强的松组 SDHA 蛋白较模型组低 ($P<0.05$)。见图 5、表 6。

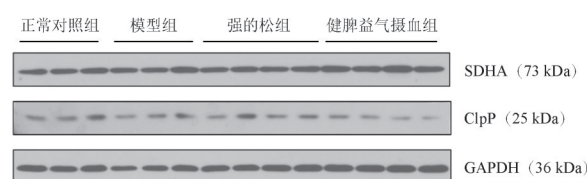


图 5 各组脑 SDHA、ClpP 蛋白免疫印迹图

脾益气摄血高剂量组脑组织中 SDHA mRNA 表达均较模型组低 ($P<0.05$)。各组脑组织 ClpP mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 7。

表 7 各组脑组织和肺组织中 SDHA、ClpP、LonP1 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	脑 SDHA	脑 ClpP	脑 LonP1	肺 SDHA	肺 ClpP	肺 LonP1
正常对照组	18	1	1	1	1	1	1
模型组	18	1.35±0.05*	1.07±0.07	0.88±0.05*	1.97±0.11*	1.84±0.31*	1.83±0.12*
强的松组	18	1.12±0.06 ^Δ	1.04±0.10	0.95±0.04	1.12±0.07	1.85±0.30	1.92±0.13
健脾益气摄血中剂量组	18	1.35±0.11	1.03±0.06	0.88±0.10	1.82±0.01	1.72±0.19	1.76±0.16
健脾益气摄血高剂量组	18	1.01±0.18 ^Δ	0.98±0.04	0.94±0.05	2.12±0.06	2.24±0.29	2.23±0.14 ^Δ
<i>F</i> 值		9.673	0.958	2.482	139.808	10.089	39.261
<i>P</i> 值		<0.05	0.471	0.111	<0.05	<0.05	<0.05

与正常对照组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3.6 各组肺组织中 SDHA、LonP1、LonP1 蛋白与基因表达比较

本实验重复电泳 3 次均未观察到 ClpP 条带，故结果仅对肺组织中 SDHA、LonP1 蛋白条带进行相对定量。模型组肺组织中 SDHA 蛋白表达水平较正常对照组低 ($P<0.05$)。健脾益气摄血组肺组织中

LonP1 和 SDHA 蛋白表达均较模型组高 ($P<0.05$)，强的松组肺组织中 SDHA 蛋白表达较模型组高 ($P<0.05$)。见图 6、表 6。

模型组肺组织中 SDHA、ClpP 及 LonP1 mRNA 表达均较正常对照组高 ($P<0.05$)。健脾益气摄血高剂量组肺脏组织 LonP1 mRNA 表达较模型组高

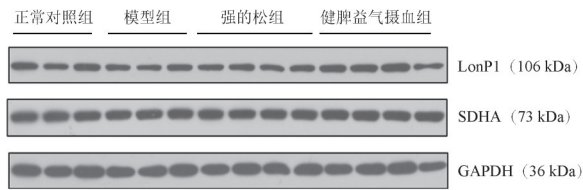


图6 各组肺脏SDHA、LonP1蛋白免疫印迹图

($P<0.05$)。见表7。

3.7 各组骨骼肌组织中SDHA、ClpP、LonP1蛋白与基因表达比较

模型组骨骼肌组织中ClpP、LonP1蛋白表达较正常对照组高 ($P<0.05$)。健脾益气摄血组骨骼肌组织中SDHA蛋白表达较模型组高 ($P<0.05$)，健脾益气摄血组骨骼肌组织中ClpP蛋白表达较模型组低 ($P<0.05$)；强的松组骨骼肌组织中ClpP、LonP1蛋白表达均较模型组低 ($P<0.05$)。见图7、表8。

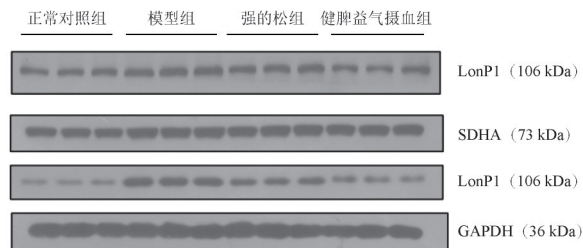


图7 各组骨骼肌SDHA、ClpP、LonP1蛋白免疫印迹图

表8 各组骨骼肌组织中SDHA、ClpP、LonP1蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	SDHA 蛋白	ClpP 蛋白	LonP1 蛋白
正常对照组	18	0.88±0.08	0.36±0.04	0.62±0.08
模型组	18	1.00±0.05	0.92±0.11*	0.82±0.01*
强的松组	18	0.95±0.09	0.60±0.10 ^Δ	0.73±0.11 ^Δ
健脾益气摄血组	18	1.12±0.06 ^Δ	0.46±0.05 ^Δ	0.78±0.17
<i>F</i> 值		4.126	15.708	8.368
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

与正常对照组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较， $\Delta P<0.05$ 。

模型组骨骼肌组织中SDHA、ClpP mRNA表达较正常对照组高 ($P<0.05$)。强的松组骨骼肌组织中ClpP、LonP1 mRNA表达较模型组低 ($P<0.05$)，健脾益气摄血中剂量组骨骼肌组织中SDHA、ClpP、LonP1 mRNA表达均较模型组低 ($P<0.05$)，健脾益气摄血高剂量组骨骼肌组织中ClpP、LonP1 mRNA表达均较模型组低 ($P<0.05$)。见表9。

4 讨论

线粒体是细胞内氧化磷酸化和三磷酸腺苷

表9 各组骨骼肌组织中SDHA、ClpP、LonP1 mRNA表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	SDHA	ClpP	LonP1
正常对照组	18	1	1	1
模型组	18	1.23±0.06*	1.18±0.01*	1.05±0.04
强的松组	18	1.12±0.05	1.04±0.05 ^Δ	0.98±0.01 ^Δ
健脾益气摄血中剂量组	18	0.82±0.03 ^Δ	0.85±0.06 ^Δ	0.62±0.09 ^Δ
健脾益气摄血高剂量组	18	1.05±0.12	1.02±0.06 ^Δ	0.87±0.09 ^Δ
<i>F</i> 值		16.975	20.566	26.807
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

与正常对照组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较， $\Delta P<0.05$ 。

(ATP) 合成的主要场所，为生命活动提供95%的能量^[2-4]。因此，聚焦于线粒体关键蛋白质与酶可能是阐明药物作用机制的潜在靶点。本研究基于ITP发病和患者乏力症状与线粒体能量代谢失衡密切相关^[5-6]，开展了健脾益气摄血方调控构成线粒体电子传递链复合物Ⅱ的SDHA表达，及维护线粒体功能稳态（调节关键蛋白酶ClpP及LonP1表达）两方面的研究。健脾益气摄血方中黄芪性温，具有健脾益气固表功效，善治诸气虚，为君药。党参性平，补中益气、健脾益肺；茯苓味甘、淡，渗湿利水、健脾和胃；白术苦、甘，健脾益气。三药合用健脾益气，为臣药。阿胶甘，平，补血止血、滋阴润肺；茜草味苦性寒，祛瘀通经、凉血止血，二药合用止血功效更强，为佐药。炙甘草味甘补脾益气，缓和药性，为使药。诸药合用有健脾益气、补血养血的功效。研究^[7]表明，健脾摄血颗粒改善207例ITP患者“脾不统血证”（脾气虚型）ITP症状及止血疗效，明显优于强的松。

4.1 健脾益气摄血方通过调控SDHA表达影响线粒体功能

琥珀酸脱氢酶（SDH）参与三羧酸循环，构成线粒体电子传递链复合物，由SDHA、铁硫蛋白亚基（SDHB）、疏水亚基（SDHC）组成^[8]。SDHA缺失会导致线粒体复合物Ⅱ缺陷，线粒体复合物Ⅱ可通过调控线粒体功能来增强造血干细胞的自我更新能力^[9]。SDHA基因突变可导致SDH失活，进而导致线粒体三羧酸循环功能障碍^[10]。研究表明，SDH功能异常与肌肉无力、易疲乏有一定关系^[11-12]，其表达缺失可引起多种疾病^[13]。既往研究发现，在细胞处于应激状态时，SDHA在转录和蛋白质水平表达上均会上调^[14]。故ITP小鼠体内SDHA表达发生变化，可能是注射APS后产生应激

反应,使SDHA代偿性增高。小鼠负重游泳实验的极高强度运动可能加剧小鼠应激反应^[8, 15],对SDHA表达产生一定影响。本研究发现,SDHA在ITP模型小鼠的脾脏、心脏、脑组织中表达升高,强的松和健脾益气摄血方能使脾脏SDHA蛋白表达下调,与相应组织的SDHA转录水平检测结果基本一致。提示健脾益气摄血方能够调节ITP小鼠SDHA的表达,从而改善小鼠线粒体功能,缓解乏力症状。

4.2 健脾益气摄血方通过调控ClpP、LonP1表达维护线粒体稳态

线粒体蛋白质稳态是指线粒体内约1 200种蛋白质的质与量动态平衡的维持^[16]。ClpP、LonP1等蛋白酶利用ATP产生的能量与底物蛋白分子结合,从而水解异常折叠的蛋白质,ClpP参与线粒体蛋白质的跨膜转运、折叠和去折叠,LonP1参与呼吸链复合物的组装和线粒体DNA稳定性的维持,多途径维护线粒体功能和稳态^[15]。且ClpP蛋白酶参与多种恶性肿瘤的发病过程^[17-18]。ClpP和LonP1目前已经成为多种肿瘤临床监测和治疗的可靠靶点。

本研究结果显示ClpP在ITP模型小鼠脾脏、心脏和骨骼肌组织中表达均高,各治疗组脾脏ClpP表达均低。其中,强的松与健脾益气摄血方可使ITP小鼠脾脏组织中ClpP表达下降,健脾益气摄血方可使骨骼肌组织ClpP表达下降至正常水平;强的松和健脾益气摄血方可使ITP小鼠心脏组织ClpP表达明显回降。该表达趋势在各组织相应的转录水平检测中也得到验证。细胞应激时,线粒体内某些蛋白可能会发生变性或错误折叠,则可激发线粒体未折叠蛋白反应(UPRmt)^[18-19]。既往研究发现,当未折叠蛋白在哺乳动物细胞线粒体基质中发生堆积,可引起ClpP以及其他分子伴侣表达增高。ITP小鼠ClpP表达在转录水平和翻译水平均高,可能是由于注射APS造模后出现应激反应,导致ClpP表达上调。短期内轻度线粒体应激所启动的UPRmt属于细胞内防御性应答反应,可预防线粒体损伤,维护线粒体功能;但长期反复的线粒体应激则介导细胞凋亡,加剧细胞的不可逆性损伤。在健脾益气摄血方、强的松的干预下,ITP小鼠ClpP表达在转录水平和翻译水平均出现不同程度地回降,说明健脾益气摄血方和强的松能够使线粒体应激得到缓解。

本研究结果显示,ITP小鼠心脏和骨骼肌组织

中LonP1的表达明显上升,健脾益气摄血方可使其表达回降,其中,中剂量健脾益气摄血方可使LonP1 mRNA表达恢复至正常水平。而LonP1在ITP小鼠脾脏组织中表达下降,强的松与健脾益气摄血方均可提升其表达。有研究结果表明,在内质网功能损伤等应激条件下,LonP1表达会高,避免内质网应激引起线粒体功能性损伤^[20]。本研究中的ITP小鼠心脏和骨骼肌中LonP1反应性上调可能是一种应激状态下的保护机制。经健脾益气摄血方干预后,应激状态解除,LonP1表达恢复到正常水平。有研究显示,线粒体的生物学行为具有多样性,LonP1作为线粒体中重要的蛋白酶,其作用靶点非常广泛,在不同细胞系中作用也不尽相同^[21-23]。这可能解释了本研究中ITP小鼠LonP1表达趋势在脾脏组织和心脏、骨骼肌的差异。

本研究中,ITP小鼠脾脏与脑组织中未观察到ClpP、LonP1的蛋白条带,重复电泳3次均得到相同结果。在细胞分化、应激反应以及转录后调控等动态条件下,基因在蛋白质水平的表达并不完全由转录水平决定^[24-25],基因本身的转录效率以及自噬或泛素蛋白酶途径等作用均会影响蛋白的最终表达^[26-28]。这可能解释了本研究中个别组织的Western blotting与qPCR检测结果并不完全一致,但是这些因素的排除有赖于更多实验方法加以验证。

综上所述,ITP小鼠造模成功后,在线粒体应激条件下,小鼠部分脏器及骨骼肌组织中SDHA、ClpP、LonP1表达高,健脾益气摄血方和强的松干预后SDHA、ClpP、LonP1表达在转录水平和翻译水平均出现不同程度地回降,且该作用无明显的剂量依赖性。小鼠脾脏、心脏和骨骼肌组织对造模方法及健脾益气摄血方治疗反应更为敏感,可能是中医药治疗ITP乏力症状机制研究的优势脏器和组织,这一点与中医学所秉持的“心主血,肝藏血,脾能统摄于血”以及“脾主四肢”等观念不谋而合,从而进一步丰富了“脾主统血”理论的科学内涵与“脾主统血”辨治ITP的理论依据。

参考文献

- [1] BOLTON-MAGGS P, GEORGE JN. Immune thrombocytopenia treatment[J]. N Engl J Med, 2021,385(10):948-950.
- [2] ZHANG Y, WANG J, GAO J, et al. Jianpi Yiqi Shexue ameliorates immune thrombocytopenia related fatigue by

- regulating mitochondrial function[J]. *Ann Palliat Med*, 2021,10(1):156–168.
- [3] ZHANG YY, JIANG M, WANG J, et al. The hemostatic mechanism of “treated the spleen” therapy on ITP based on the characteristics of vasoactive factors[J]. *Ann Palliat Med*, 2021,10(4):4612–4622.
- [4] 郎海燕, 张玲, 王佳, 等. 健脾益气摄血颗粒影响免疫性血小板减少症患者出血与免疫功能研究[J]. *医学研究杂志*, 2019,48(9):45–49.
- [5] WANG J, LI Y, WANG C, et al. Efficacy and safety of the combination treatment of rituximab and dexamethasone for adults with primary immune thrombocytopenia (ITP): A meta-analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2018:1316096.
- [6] SUBRAMANIAN C, FRANK MW, TANGALLAPALLY R, et al. Pantothenate kinase activation relieves coenzyme A sequestration and improves mitochondrial function in mice with propionic acidemia[J]. *Sci Transl Med*, 2021,13(611):eabf5965.
- [7] 郎海燕, 马薇, 张雅月. 益气维血胶囊联合琥珀酸亚铁片治疗缺铁性贫血的临床效果[J]. *临床合理用药杂志*, 2021,14(20):8–11.
- [8] 南凌杉, 张雅月, 王佳, 等. 基于线粒体功能特性研究健脾益气摄血方调控 ITP 乏力机制[J]. *世界中医药*, 2021, 16(3):361–366.
- [9] LI ST, HUANG D, SHEN S, et al. Myc-mediated SDHA acetylation triggers epigenetic regulation of gene expression and tumorigenesis[J]. *Nat Metab*, 2020, 2(3): 256–269.
- [10] DAVIDOFF DF, LUXFORD C, KIM E, et al. Measuring tumor succinate and fumarate to resolve pathogenicity of an SDHA variant[J]. *Clin Chem*, 2021,67(4):696–699.
- [11] 刘雅峰, 郎海燕, 杨丽美, 等. 脾主统血与多脏腑综合功能效应关联性现代释义[J]. *中华中医药杂志*, 2018,33 (8):3679–3681.
- [12] KAMAI T, HIGASHI S, MURAKAMI S, et al. Single nucleotide variants of succinate dehydrogenase A gene in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2021,112(8):3375–3387.
- [13] WURTH R, JHA A, KAMILARIS C, et al. A case of Carney triad complicated by renal cell carcinoma and a germline SDHA pathogenic variant[J]. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*, 2021:20–0170.
- [14] PUGJOL VL, RUIZ SL, ROJAS LL, et al. P-98 SUCNR1/SDHA profiles as predictors of HNSCC prognosis[J]. *Oral Oncol*, 2021,118(S):12.
- [15] 郎海燕, 褚雨霏, 马薇, 等. 免疫性血小板减少症病证结合动物模型研究[J]. *中医药信息*, 2017,34(1):39–43.
- [16] LUO B, MA Y, ZHOU Y, et al. Human ClpP protease, a promising therapy target for diseases of mitochondrial dysfunction[J]. *Drug Discov Today*, 2021,26(4):968–981.
- [17] OGUNLEYE O, KARIMI V, GUJADHUR N. Listeria bacteremia presenting with cerebral abscess and endocarditis in an elderly patient with chronic immune thrombocytopenia[J]. *Cureus*, 2021,13(7):e16601.
- [18] COZZOLINO M, IMAMOGLU G, RISTORI E, et al. Mitochondrial dysfunction caused by targeted deletion of CLpP results in telomere shortening in oocytes and somatic cells[J]. *Fertil Steril*, 2021,116(3S):E411–E411.
- [19] 吴晓勇, 王云龙, 毕莲, 等. 基于“脾主肌肉”理论治疗免疫性血小板减少症相关性疲劳[J]. *北京中医药*, 2022,41 (1):45–46.
- [20] KEY J, KOHLI A, BÄRCENA C, et al. Global proteome of LonP1+/- mouse embryonal fibroblasts reveals impact on respiratory chain, but no interdependence between eral1 and mitoribosomes[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(18):4538.
- [21] 覃乐荣, 郎海燕, 湛海燕, 等. 基于数据挖掘的中药治疗免疫性血小板减少症用药思路[J]. *山东中医药大学学报*, 2022,46(5):610–617.
- [22] LI CJ, LIN LT, TSUI KH. Dehydroepiandrosterone shifts energy metabolism to increase mitochondrial biogenesis in female fertility with advancing age[J]. *Nutrients*, 2021, 13(7):2449.
- [23] SP N, KANG, DY, et al. Methylsulfonylmethane inhibits cortisol-induced stress through p53 mediated SDHA/HPRT1 expression in racehorse skeletal muscle cells: A primary step against exercise stress[J]. *Exp Ther Med*, 2020,19(1):214–222.
- [24] BHANDARI V, WONG KS, ZHOU JL, et al. The role of ClpP protease in bacterial pathogenesis and human diseases[J]. *ACS Chem Biol*, 2018,13(6):1413–1425.
- [25] FECHER C, TROVÒ L, MÜLLER SA, et al. Cell-type-specific profiling of brain mitochondria reveals functional and molecular diversity[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(10): 1731–1742.
- [26] MORGANTI C, BONORA M, ITO K, et al. Electron transport chain complex II sustains high mitochondrial membrane potential in hematopoietic stem and progenitor cells[J]. *Stem Cell Res*, 2019,40:101573.
- [27] 黄子明, 侯丽, 郎海燕, 等. 健脾益气摄血方对原发免疫性血小板减少症模型小鼠肠道免疫的影响[J]. *中医杂志*, 2022,63(4):377–382.
- [28] LIU PC, SSU CT, TSAO YP, et al. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4-Ig (CTLA-4-Ig) suppresses *Staphylococcus aureus*-induced CD80, CD86, and pro-inflammatory cytokine expression in human B cells[J]. *Arthritis Res Ther*, 2020,22(1):64.

Effect and mechanism of Jianpi Yiqi Shexue Prescription for fatigue in immune thrombocytopenia mice

NAN Lingshan¹, WANG Chong², LANG Haiyan², PAN Yimin², MA Wei², WANG Zhigang², WEI Diu², YANG Lu², HAN Lizhen², CHEN Xinyi²

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Department of Hematology, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700)

ABSTRACT Objective To explore the effect and mechanism of Jianpi Yiqi Shexue Prescription (JPYQ SX) for immune thrombocytopenia (ITP) mice. **Methods** A total of 90 SPF BALB/c mice were divided into normal control group, model group, prednisone group, Jianpi Yiqi Shexue Prescription (JPYQ SX) medium and high dose group according to random number table method with 18 in each group. The normal control group was intraperitoneally injected with 100 μ L/20 g of physiological saline, and the other groups were intraperitoneally injected with 100 μ L/20 g of APS once a day to establish ITP mouse models. From the 8th day of modeling, the normal control group and model group were given 0.1 mL/10 g saline by gavage, while the prednisone group and the middle and high dose groups of invigorating spleen and benefiting qi were given 0.1 mL/10 g corresponding drugs by gavage once a day for 8 days. The protein expressions of SDHA, ClpP and LonP1 in tissues and organs of mice were detected by Western blotting; the mRNA expressions of SDHA, ClpP and LonP1 detected by real-time quantitative PCR (qPCR). **Results** The expression of SDHA protein in the spleen, heart and brain tissue of the model group was higher than that of the control group ($P < 0.05$). The expression of SDHA protein in the spleen of the prednisone group and the JPYQ SX group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$); The expression of ClpP protein in the spleen, heart and skeletal muscle of the model group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$), and the expression of ClpP in the spleen of each treatment group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$); the expression of LonP1 in the spleen tissue of the model group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$), the expression of LonP1 in the spleen tissue of the prednisone group was significantly higher than that of the model group ($P < 0.05$), and the expression of LonP1 in the heart and skeletal muscle of the model group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$), and the LonP1 expression in skeletal muscle of the prednisone group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$). The protein detection results were basically consistent with the transcription level detection results of the corresponding tissues. **Conclusion** JPYQ SX can regulate mitochondrial function in ITP mice so as to relieve fatigue.

Keywords Immune thrombocytopenia; fatigue; Jianpi Yiqi Shexue Prescription (JPYQ SX); mitochondrial function; mitochondrial protein steady state; mouse

(收稿日期: 2023-10-24)

《北京中医药》杂志 2024 年征稿、征订启事

《北京中医药》杂志是由北京市中医管理局主管,北京中医药学会、北京中西医结合学会、北京市中药研究所共同主办的国内外公开发行的中医药科技期刊。杂志为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、全国中医药优秀期刊、中国期刊全文数据库全文收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。本刊常设有临床研究、实验研究、学验传承、学术探讨、临证纵横、医案医话、文献综述等栏目。

本刊为月刊,大 16 开本,112 页,每月 25 日出版。每册定价 20.00 元,全年 240.00 元。中国标准连续出版物号 ISSN 1674-1307; CN 11-5635/R。全国邮局均可订阅,国内邮发代号 2-587;国外邮发代号 M 668。

编辑部地址:北京市东单三条甲 7 号《北京中医药》编辑部;邮编:100005;

电话:(010) 6524 7704; E-mail: bjzy1589@126.com (仅用于联系,不接受投稿)。

投稿系统入口位于杂志官方网站“<http://www.bjtcn.net>”。

(本刊编辑部)