

## 黄芪和当归的主要活性成分配伍促进衰老造血干细胞增殖作用的研究

朱嘉欢, 黄小平, 邓常清\*

湖南中医药大学 分子病理实验室, 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

**摘要:**目的 探讨黄芪和当归的主要活性成分黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷和阿魏酸配伍对衰老造血干细胞(HSCs)增殖的影响,并从细胞周期调控研究其作用机制。方法 以三丁基过氧化氢(T-BHP)构建小鼠HSCs衰老模型,研究不同质量浓度5种活性成分对HSCs衰老和增殖的影响,寻找可促进细胞增殖的主要活性成分。在此基础上,采用正交试验研究5种活性成分配伍对HSCs衰老和增殖的影响,寻找5种活性成分促进细胞增殖的合理配伍。最后,采用HSCs衰老模型,制备黄芪-当归1:1配伍含药血浆,设立对照组、模型组、空白血浆组、阿魏酸组、黄芪甲苷组、芒柄花素组、毛蕊异黄酮组、毛蕊异黄酮苷组、活性成分配伍组、黄芪-当归1:1含药血浆组,药物作用于衰老细胞,以SA- $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -Gal)染色法测定HSCs衰老率,CCK-8法测定细胞增殖率,流式细胞术检测细胞周期分布,Western blotting法检测Cyclin D1、细胞周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)蛋白表达。结果 阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素均可显著促进衰老HSCs增殖和降低细胞衰老率,而毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷单独应用对HSCs增殖和细胞衰老率无显著影响。正交试验发现,以阿魏酸、芒柄花素和黄芪甲苷为基础因子,毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷为次要因子进行配伍的5种活性成分组合促细胞增殖和降低细胞衰老率的作用最强。阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素、活性成分配伍、含药血浆均可降低细胞衰老率,使G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞减少,G<sub>2</sub>/M+S期细胞增加,并使Cyclin D1和CDK4蛋白表达增强。以上效应以活性成分配伍组和含药血浆组最强。结论 黄芪和当归的主要活性成分阿魏酸、黄芪甲苷和芒柄花素对衰老HSCs具有促增殖和改善衰老作用,而毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷单用时并无明显的作用。当5种活性成分配伍后对衰老HSCs的促增殖作用最强,并可改善HSCs衰老,促进衰老HSCs由静止期向增殖期转换。黄芪和当归的主要活性成分及其配伍促HSCs增殖和抗HSCs衰老的作用可能与调节细胞周期相关蛋白表达及促进细胞周期转换有关。

**关键词:**造血干细胞;阿魏酸;黄芪甲苷;芒柄花素;毛蕊异黄酮;毛蕊异黄酮苷;黄芪;当归;细胞周期蛋白D1;细胞周期蛋白依赖性激酶

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:0253-2670(2019)01-0111-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.018

## Main active components combination of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* promotes proliferation of aging hematopoietic stem cells

ZHU Jia-huan, HUANG Xiao-ping, DENG Chang-qing

Molecular Pathology Laboratory, Hunan Key Laboratory of Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Cardio-cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

**Abstract: Objective** To explore the effects of the combination of main active components of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* such as astragaloside IV, formononetin, calycosin, campanulin, ferulic acid on aging hematopoietic stem cells (HSCs), and clarify its mechanism through cell cycle regulation. **Methods** The aging model of HSCs in mice was established with three butyl hydrogen peroxide (t-BHP) to research the effects of five active components of different concentrations on the senescence and the proliferation of HSCs, and seek the main active components which could promote cell proliferation. Finally, HSCs aging model was used to prepare the drug-containing plasm of *A. membranaceus* combined with *A. sinensis* at 1:1 ratio. Furthermore, blank control group, model group, blank plasma group, ferulic acid group, astragaloside IV group, formononetin group, calycosin group, calycosin

收稿日期: 2018-07-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473581);“中西医结合防治心脑血管疾病的相关基础研究”湖南省高校科技创新团队;“中医药防治心脑血管疾病基础研究”湖南省自然科学创新群体基金

作者简介: 朱嘉欢, 硕士研究生, 主要研究方向为方剂配伍药效物质及原理研究。E-mail: 609534425@qq.com

\*通信作者 邓常清, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为心脑血管疾病防治及方剂配伍原理的研究。

Tel: (0731)88459426 E-mail: dchangq@sohu.com

glycoside group, combination group of main active components, drug-containing plasma group of *A. membranaceus* combined with *A. sinensis* at 1 : 1 ratio were acted on aging cells, HSCs senescence rate was tested by SA- $\beta$ -galactosidase staining and cell proliferation rate was measured by CCK-8 method, cell cycle distribution was determined by flow cytometry, and the protein expression of Cyclin D1 and cyclin dependent kinase 4 (CDK4) were detected by Western blotting. **Results** Ferulic acid, astragaloside IV, and formononetin significantly promoted the proliferation of aging HSCs and decreased the positive rate of senescent cells, but the effects of calycosin and calycosin glycoside on HSCs proliferation and the positive rate of senescent cells were not significant. The orthogonal experiment showed that the combination of five active components that ferulic acid, formononetin, astragaloside IV were taken as basic factors, and calycosin and calycosin glycoside were taken as secondary factors, had the strongest effect on promoting cell proliferation and decreasing the positive rate of senescent cells. Ferulic acid, astragaloside IV, formononetin, active component combination and drug-containing plasma decreased the positive rate of senescent cells, down-regulated G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells while up-regulated G<sub>2</sub>/M + S phase cells, and increased the expression of Cyclin D1 and CDK4 proteins. The above effects in the active component combination group and the drug-containing plasma group were the best. **Conclusion** The main active components of *A. membranaceus* and *A. sinensis* such as ferulic acid, astragaloside IV, and formononetin can promote the proliferation and improve the senescent of aging HSCs, however, calycosin and calycosin glycoside have no obvious effect. The effect of promoting the proliferation is the strongest on aging HSCs when five active components are combined, and the combination can improve HSCs senescence, enhance the transformation of HSCs from static stage to proliferative stage. The main active components and the combination of *A. membranaceus* and *A. sinensis* can promote HSCs proliferation and antagonize HSCs senescent, which may be related to regulating the expression of cell cycle related proteins and promoting the transformation of cell cycle.

**Key words:** hematopoietic stem cells; ferulic acid; astragaloside IV; formononetin; calycosin; campanulin; *Angelica membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; *Astragalus sinensis* (Oliv.) Diels; cyclin D1; cyclin dependent kinase

血细胞的生成是多能造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 在特定造血微环境的网络调控下, 增殖分化成各种成熟血细胞的动态平衡过程。人类 HSCs 主要存在于骨髓内, 外周血中也含有少量的 HSCs。HSCs 具有高度自我更新和增殖的能力, 可以分化成各种血细胞的前体细胞 (如造血祖细胞), 然后在造血微环境的作用下再定向增殖分化成为各种原始和成熟血细胞, 最后, 这些成熟的血细胞由骨髓进入血液, 完成造血<sup>[1]</sup>。由于骨髓 HSCs 分化程度低, 增殖活性高, 对化疗药物、辐射等因素敏感, 因而, 化疗药物、辐射易损伤 HSCs、造血祖细胞和骨髓造血微环境, 引起骨髓抑制<sup>[2-3]</sup>。多种原因引起的骨髓造血功能抑制与 HSCs 密切相关, HSCs 衰老导致的功能抑制是引起造血功能障碍的主要原因。因此, 深入研究 HSCs 衰老的机制对防治造血功能低下相关疾病有重要的科学意义, 改善 HSCs 衰老为造血功能低下防治的重要策略。

黄芪和当归的配伍应用最有名的是由李东垣所创的黄芪、当归配比为 5 : 1 的当归补血汤, 由黄芪一两、当归二钱组成, 主治气虚发热之证。现代以当归补血汤治疗多种贫血和造血功能低下有较好疗效。以往研究表明, 黄芪和当归配伍可增加骨髓有核细胞数和血中造血生长因子 (HGF) 水平, 抑制

HSCs 衰老和促进其增殖<sup>[4-5]</sup>, 升高外周血像<sup>[6-7]</sup>, 其中以黄芪和当归 1 : 1 配伍的促造血作用最强。进一步以 HSCs 衰老模型研究发现, 黄芪-当归 1 : 1 配伍可促进衰老 HSCs 增殖, 促进细胞周期转换<sup>[8]</sup>。唐蓉等<sup>[9]</sup>研究表明, 黄芪-当归 1 : 1 配伍时由小肠吸收的主要成分是阿魏酸、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷和芒柄花素 5 种活性成分。由于中药多是通过口服给药吸收后进入体内发挥作用, 因此, 推测此 5 种活性成分可能为其促造血作用的主要药效物质。但是, 这 5 种成分配伍能否发挥黄芪、当归配伍时的功效, 其促造血的作用机制是什么, 这些问题尚未阐明。本实验采用 HSCs 衰老模型, 研究黄芪和当归的主要活性成分配伍对衰老 HSCs 增殖的影响, 以明确其促造血作用的主要药效物质, 为其合理应用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 雄性, 体质量 20~25 g, 动物质量合格证号 SCXK (湘) 2016-0002; 清洁级 SD 雄性大鼠, 体质量 180~220 g, 动物质量合格证号 SYXK (湘) 2016-0002; 动物均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验场地湖南中医药大学动物实验中心 [场地许可证号 SYXK

(湘) 2013-0005]。

## 1.2 主要试剂

优级胎牛血清(批号 P30-2602)、IMDM 培养液(批号 12440046), 美国 Hyclone 公司; 二甲亚砜(DMSO, 批号 ST038)、三丁基过氧化氢(T-BHP, 批号 STBD5969V, 用时以含 0.1% DMSO-IMDM 培养液溶解)、青链霉素混合液(批号 SV30010), 美国 Sigma 公司;  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -Gal) 染色试剂盒(碧云天生物有限公司, 批号 CO602); 细胞增殖及细胞毒性检测(CCK-8 法) 试剂盒(武汉博士德生物有限公司, 批号 AR1160-500); Anti-Sca-1-PE(批号 130-102-297)、Anti-PE MicroBeads(批号 130-048-701)、MS 分选柱(批号 130-042-201), 德国 Miltenyi 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS, 吉诺生物医药技术有限公司, 批号 GNM20012); 牛血清白蛋白(BSA, 批号 WB07012)、乙二胺四乙酸(EDTA, 批号 WB07014), 长沙维尔生物科技有限公司; Ficoll 淋巴细胞分离液(天津灏洋华科生物科技有限公司, 批号 TBD2013LR); 大鼠抗小鼠  $\beta$ -actin 单克隆抗体(批号 60008-1-Ig)、兔抗小鼠细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1) 单克隆抗体(批号 04-1151)、兔抗小鼠细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) 单克隆抗体(批号 ab199728)、辣根过氧化物酶(HRP) 标记羊抗兔二抗(批号 ab205718)、HRP 标记羊抗鼠二抗(批号 ab205719), Abcom 公司。

## 1.3 实验药物

黄芪甲苷(批号 16022804)、毛蕊异黄酮(批号 16031110)、毛蕊异黄酮苷(批号 16031205)、芒柄花素(批号 16031005)、阿魏酸(批号 rq0838), 质量分数 $\geq 98\%$ , 均购于上海吉雅生物科技有限公司; 黄芪和当归饮片由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供, 由湖南中医药大学第一附属医院左亚杰教授鉴定, 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 产地内蒙古; 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 产地甘肃。

## 2 方法

### 2.1 小鼠骨髓单个核细胞(BMNCs)制备及 Sca-1<sup>+</sup>HSCs 分离纯化和鉴定

小鼠颈椎脱臼处死, 无菌条件下取出股骨和胫骨, PBS(含 2 mmol/L EDTA、0.5% BSA, pH 7.4) 反复冲洗骨髓腔, 制备成单细胞悬液, 缓缓加入到

Ficoll 淋巴细胞分离液上方, 4 °C、2 000 r/min 离心 20 min, 吸取中间白膜层至新离心管中, PBS 洗涤 3 次, 即得 BMNCs。取 BMNCs 加入 90  $\mu$ L PBS 和 10  $\mu$ L Anti-Sca-1-PE 抗体标记细胞, 4 °C 孵育 10 min, 800 r/min 离心 5 min 弃上清, 加入 80  $\mu$ L PBS 和 20  $\mu$ L Anti-PE Micro Beads, 4 °C 孵育 20 min, 800 r/min 离心 5 min 后弃上清, 以 0.5 mL PBS 重悬细胞, 加入 MS 分选柱内, 流出道收集未标记细胞(即 Sca-1<sup>-</sup>细胞), 0.5 mL PBS 洗柱 3 次。阳性细胞会留滞于柱内, 其他细胞流出分选柱。取下分选柱, 加入 0.5 mL PBS 冲出标记细胞(即 Sca-1<sup>+</sup>HSCs)。收集 Sca-1<sup>+</sup>HSCs, 流式细胞仪检测分选前后 Sca-1<sup>+</sup>HSCs 阳性率。分选前 BMNCs 中 Sca-1<sup>+</sup>细胞为 3.6%, 而分选后 Sca-1<sup>+</sup>细胞高达 92.39%, 表明分选后 HSCs 纯度大幅度提高。

将洗涤后的 HSCs 以培养液(含 10% BSA 的 IMDM 培养基, 100 U/mL 青霉素, 100 g/L 链霉素) 调细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL, 接种培养瓶内, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。每 2 天换液 1 次。

## 2.2 实验药物的制备

**2.2.1 黄芪-当归配伍提取物的制备** 设立黄芪-当归 1:1 配伍, 大鼠黄芪和当归配伍的临床等效剂量为 3.8 g/kg, 含药血浆制备的给药剂量取临床等效剂量 10 倍, 为 38 g/kg。分别称取药材, 以水加热回流法提取 3 次(第 1 次 8 倍量水, 提取 1 h; 第 2、3 次 6 倍量水, 提取 1 h), 合并 3 次提取液, 滤过, 60 °C 真空减压浓缩得浸膏, 调药物质量浓度为 1.9 g/mL(相当于黄芪生药质量浓度 0.95 g/mL, 当归生药质量浓度 0.95 g/mL)。药液加入 0.1% 的苯甲酸钠, 4 °C 冷藏备用。

**2.2.2 含药血浆的制备** 参照文献方法<sup>[7]</sup>, SD 大鼠 20 只, 随机分为 2 组, 每组 10 只, 空白组 ig 等量双蒸水, 黄芪-当归 1:1 配伍组 ig 黄芪-当归配伍提取物 38 g/kg(黄芪 19 g/kg、当归 19 g/kg), 每天 1 次, 连续给药 7 d, 末次给药 2 h 后腹主动脉取血, 以 2% EDTA-2Na 抗凝, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血浆, 即分别为空白血浆和含药血浆, 将同组各动物血浆等量混合, 分装后 -80 °C 保存备用。

**2.2.3 各活性成分供试药液制备** 黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素以 DMSO-PBS 溶解, 阿魏酸以 DMSO-IMDM 溶解, 制备成储存液, 用时以 IMDM 培养基稀释, 培养基中 DMSO 终体积分数为 0.1%。

### 2.3 CCK-8 法检测 5 种活性成分对衰老 HSCs 增殖的影响

取传代 4~6 代的 HSCs 细胞接种于 96 孔板中, 无血清培养基培养 12 h 使细胞同步化于 G<sub>0</sub> 期后, 换成含 T-BHP (100 μmol/L) 的完全培养基以诱导 HSCs 衰老, 同时加入不同质量浓度的各活性成分, 继续培养 24 h 后, 采用 CCK-8 法检测 450 nm 处吸光度 (A) 值, 以反映细胞增殖活性, 确定可促进 HSCs 增殖的主要成分。

$$\text{增殖率} = \text{实验组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值} - 1$$

### 2.4 主要活性成分与其他活性成分配伍抗 HSCs 衰老和促细胞增殖实验

在“2.3”项确定具有促 HSCs 增殖作用的主要活性成分 (阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素) 后, 以此 3 个成分为基础因子, 采用 L<sub>4</sub>(2<sup>3</sup>) 正交试验研究主要成分 (基础因子) 与毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷配伍对衰老 HSCs 增殖和衰老的影响, 分析各成分配伍对 HSCs 增殖和衰老是否有增效作用。正交试验设计方案见表 1。取 4~6 代 HSCs 接种于 96 孔培养板, 无血清培养液培养 12 h 使细胞同步于 G<sub>0</sub> 期。然后换含 T-BHP 的完全培养基, 同时加入不同活性成分, 继续培养 24 h 后, 同前以 CCK-8 法测定细胞增殖率。同时将细胞进行 SA-β-Gal 染色, 倒置显微镜下计数 400 个细胞, 计数阳性细胞, 阳性细胞胞质呈蓝色, 阴性细胞不着色。计算阳性细胞 (即衰老细胞) 率。

$$\text{衰老细胞率} = \text{阳性细胞数} / \text{细胞总数}$$

表 1 正交试验的因子与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因子		
	基础因子	毛蕊异黄酮 (A)	毛蕊异黄酮苷 (B)
1	用	用	用
2	用	不用	不用

### 2.5 各活性成分、活性成分配伍及黄芪-当归 1:1 配伍抗 HSCs 衰老和促增殖实验

在“2.4”项实验确定具有促 HSCs 增殖和抗衰老作用的活性成分配伍后, 设立对照组、模型组、空白血浆组 (10%空白血浆)、阿魏酸组 (9 μg/mL)、黄芪甲苷组 (8 μg/mL)、芒柄花素组 (6 μg/mL)、毛蕊异黄酮组 (10 μg/mL)、毛蕊异黄酮苷组 (10 μg/mL)、活性成分配伍组 (阿魏酸 9 μg/mL+黄芪甲苷 8 μg/mL+芒柄花素 6 μg/mL+毛蕊异黄酮 10

μg/mL+毛蕊异黄酮苷 10 μg/mL)、黄芪-当归 1:1 含药血浆组 (10%黄芪-当归 1:1 配伍含药血浆)。取 4~6 代 HSCs 接种于 96 孔培养板, 无血清培养液培养 12 h 使细胞同步于 G<sub>0</sub> 期。然后对照组加入完全培养液; 模型组加入等量含 T-BHP 的完全培养液; 空白血浆对照组加入 10%空白血浆和含 T-BHP 的完全培养液; 不同活性成分或活性成分配伍组加入不同活性成分或其配伍组方和含 T-BHP 的完全培养液; 黄芪-当归 1:1 含药血浆组加入 10%含药血浆和含 T-BHP 的完全培养液。继续培养 24 h 后, 同前测定细胞增殖率和衰老细胞率。

### 2.6 细胞周期测定

运用流式细胞分选术测定细胞周期。分组和处理同“2.5”项, 离心收集各组细胞 1×10<sup>6</sup> 个, 加 1 mL PBS 洗涤 1 次, 70%冰乙醇固定过夜, 加入 100 μL 牛胰核糖核酸酶 (1 g/L) 37 °C 孵育 30 min。然后加入碘化丙啶 (PI) 1 mL (用 0.01 mol/L PBS 配成终质量浓度 50 μg/mL 的 PI 工作液), 4 °C 避光染色 30 min, 测定样本细胞数不少于 2×10<sup>5</sup> 个。流式细胞仪检测各组细胞的细胞周期分布, 计数 G<sub>0</sub> 期、G<sub>1</sub> 期、G<sub>2</sub> 期、S 期、M 期细胞百分率。以 G<sub>0</sub> 期和 G<sub>1</sub> 期细胞作为静止期细胞, G<sub>2</sub> 期、S 期和 M 期为增殖期细胞。

### 2.7 Western blotting 法测定 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达

细胞处理同“2.5”项。收集各组细胞, 以 PBS 洗涤, 以总蛋白提取试剂提取细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度, 将各样品蛋白浓度调整一致, 加入适量 5×蛋白上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 冷却后加入加样孔。然后进行 SDS-PAGE 电泳, 电转法转膜。将转膜后的 PVDF 膜以封闭液封闭, 再加入用 TBST (含 5%脱脂奶粉) 稀释的 β-actin 一抗 (1:5 000)、Cyclin D1 一抗 (1:10 000)、CDK4 一抗 (1:2 000), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗 3 次, 加入 TBST 稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗 (1:6 000, 用于 CDK4、Cyclin D1 测定) 或 HRP 标记的兔抗鼠二抗 (1:5 000, 用于 β-actin 测定), 室温孵育 30 min, TBST 洗 4 次。以 ECL 化学发光试剂进行显色。AlphaEaseFC 图像处理系统分析目标条带的累积吸光度值。以目的蛋白与 β-actin 累积吸光度值比值作为蛋白相对表达量。

### 2.8 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 实验结果

以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析。组间两两比较，方差齐者用 LSD 检验，方差不齐者用 Dunnett's T3 检验。 $L_4(2^3)$  正交试验采用正交试验的方差分析，明确基础因子与次要因子之间是否有相互作用。

### 3 结果

#### 3.1 5 种活性成分对衰老 HSCs 增殖的影响

以模型组 (T-BHP 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 为对照 (增殖率为 0)，不同质量浓度阿魏酸、黄芪甲苷和芒柄花

素可显著促进衰老 HSCs 增殖，其中阿魏酸在 2.25~18.00  $\mu\text{g/mL}$ 、黄芪甲苷在 2~16  $\mu\text{g/mL}$ 、芒柄花素在 1.5~12.0  $\mu\text{g/mL}$  时促细胞增殖活性的作用呈量效关系。而毛蕊异黄酮在 2.5~40.0  $\mu\text{g/mL}$ 、毛蕊异黄酮苷在 1.25~20.00  $\mu\text{g/mL}$  时对衰老 HSCs 的促增殖作用不超过 10%，表明毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷在此质量浓度下对衰老 HSCs 无显著的促增殖作用，阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素为黄芪、当归配伍促 HSCs 增殖的主要有效成分。结果见图 1。

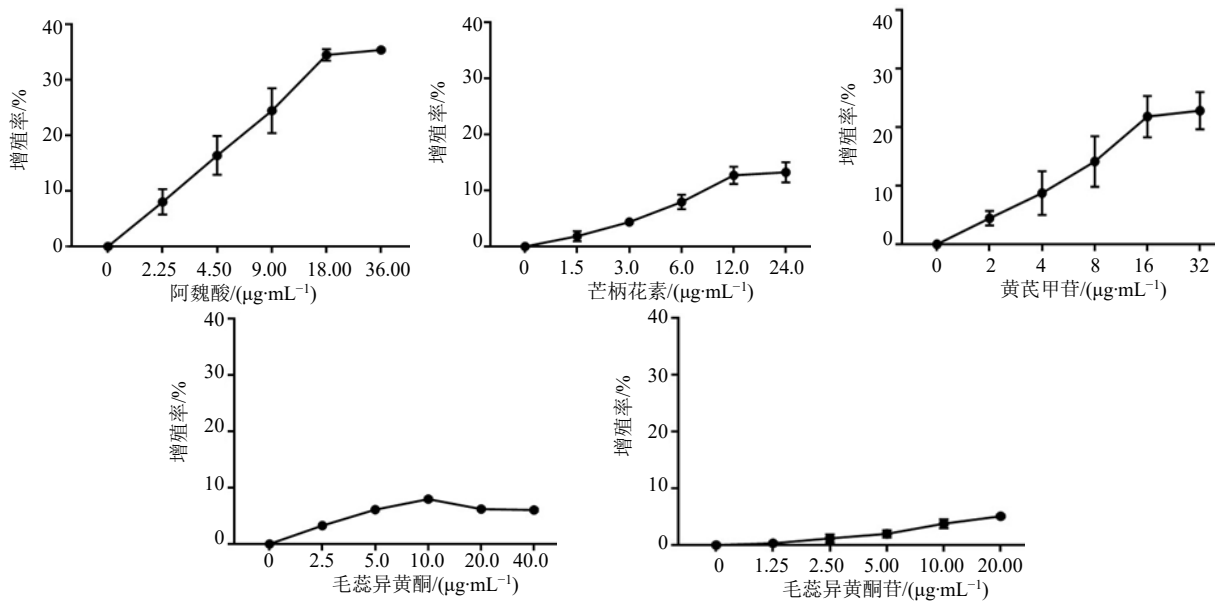


图 1 5 种活性成分促 HSCs 增殖的量效曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 1 Dose-response curve of five active components promoting HSCs proliferation ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

#### 3.2 主要成分和次要成分配伍对衰老 HSCs 增殖和衰老的影响

在确定了 5 种成分中的主要成分后，取对细胞具有显著促增殖作用的药物质量浓度 [约为药物促细胞增殖实验的半数有效浓度 ( $EC_{50}$ )] 为有效浓度，即阿魏酸为 9  $\mu\text{g/mL}$ ，黄芪甲苷为 8  $\mu\text{g/mL}$ ，芒柄花素为 6  $\mu\text{g/mL}$ ，以此 3 种成分为基础因子，毛蕊异黄酮 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 和毛蕊异黄酮苷 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 为次要因子，进行  $L_4(2^3)$  正交试验。结果表明，3 个主要活性成分配伍 (基础因子) 可显著促进 HSCs 增殖和降低细胞衰老率 ( $P < 0.05$ )。基础因子 + 毛蕊异黄酮和基础因子 + 毛蕊异黄酮苷促 HSCs 增殖和降低细胞衰老率的作用强于基础因子 ( $P < 0.05$ )。基础因子 + 毛蕊异黄酮 + 毛蕊异黄酮苷促细胞增殖和降低细胞衰老率的作用强于基础因子、基础因子 + 毛蕊异黄酮和基础因子 + 毛蕊异黄酮苷 ( $P < 0.05$ )，结果见表 2。交互作用

分析表明，毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷与基础因子配伍具有增效作用，表明主要成分阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素与次要成分毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷配伍对促 HSCs 增殖和抑制细胞衰老具有增效作用。

#### 3.3 单个活性成分、活性成分配伍与黄芪-当归 1:1 配伍含药血浆对 HSCs 增殖率和衰老率的影响

与模型组或空白血浆组比较，阿魏酸组、黄芪甲苷组、芒柄花素组、活性成分配伍组、含药血浆组均可促进 HSCs 增殖，降低细胞衰老率 ( $P < 0.05$ )；而毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷无显著的促 HSCs 增殖和降低细胞衰老率的作用 ( $P > 0.05$ )。活性成分配伍组促 HSCs 增殖和降低细胞衰老率的作用强于 5 个活性成分单用 ( $P < 0.05$ )。含药血浆组和活性成分配伍组促 HSCs 增殖和降低细胞衰老率的作用比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。结果见表 3 和图 2。

表 2 L<sub>4</sub>(2<sup>3</sup>) 正交试验结果及分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 2 Results and analysis of L<sub>4</sub>(2<sup>3</sup>) orthogonal experiment ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

试验号	1 (A)	2 (B)	3 (A×B)	药物组成	增殖率/%	衰老率/%
1	1	1	1	基础因子+毛蕊异黄酮+毛蕊异黄酮苷	86.16±4.67 <sup>oo**</sup>	22.87±1.69 <sup>oo**</sup>
2	1	2	2	基础因子+毛蕊异黄酮	63.46±3.06 <sup>oo*△△</sup>	43.08±2.56 <sup>oo**△</sup>
3	2	1	2	基础因子+毛蕊异黄酮苷	61.06±1.67 <sup>oo*△</sup>	45.64±4.62 <sup>oo*△△</sup>
4	2	2	1	基础因子	47.13±3.90 <sup>oo△△</sup>	53.57±3.21 <sup>oo△△</sup>
5				模型	0.00±0.00 <sup>☆☆</sup>	78.61±6.43 <sup>☆☆</sup>
6				空白	52.54±2.33	5.04±3.21
增殖率 Σ1	149.62	147.22	86.16			
增殖率 Σ2	108.19	110.59	171.65			
增殖率极差	41.43 <sup>*</sup>	36.63 <sup>**</sup>	85.49 <sup>**</sup>			
衰老率 Σ1	65.95	68.51	21.87			
衰老率 Σ2	99.21	96.65	142.29			
衰老率极差	33.26 <sup>*</sup>	28.14 <sup>**</sup>	120.42 <sup>**</sup>			

与空白组比较: <sup>\*\*</sup>*P*<0.01; 与模型组比较: <sup>oo</sup>*P*<0.01; 与基础因子组比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01; 与基础因子+毛蕊异黄酮+毛蕊异黄酮苷组比较: <sup>△</sup>*P*<0.05 <sup>△△</sup>*P*<0.01; 各因子两水平比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01

<sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs blank group; <sup>oo</sup>*P*<0.01 vs model group; <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs basic factor group; <sup>△</sup>*P*<0.05 <sup>△△</sup>*P*<0.01 vs basic factor + calycosin + calycosin glycoside group; <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs two levels of each factor

表 3 各组 HSCs 增殖率和衰老率的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 3 Comparisons of proliferation rate and senescence rate of HSCs in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	增殖率/%	衰老率/%
对照	86.20±5.17	8.43±2.59
模型	0.00±0.00 <sup>●●</sup>	70.67±0.83 <sup>●●</sup>
空白血浆	2.83±3.70 <sup>●●</sup>	66.80±1.43 <sup>●●</sup>
阿魏酸	36.31±0.92 <sup>☆☆△△</sup>	41.09±2.56 <sup>☆☆△△</sup>
黄芪甲苷	29.79±2.58 <sup>☆☆△△</sup>	48.56±2.81 <sup>☆☆△△</sup>
芒柄花素	17.20±3.71 <sup>☆☆△△</sup>	57.18±1.45 <sup>☆☆△△</sup>
毛蕊异黄酮	4.41±2.98 <sup>△△</sup>	67.25±0.82 <sup>△△</sup>
毛蕊异黄酮苷	3.63±1.65 <sup>△△</sup>	66.05±1.73 <sup>△△</sup>
活性成分伍伍	74.75±1.05 <sup>☆☆</sup>	26.05±2.42 <sup>☆☆</sup>
含药血浆	75.03±5.55 <sup>**</sup>	23.15±3.21 <sup>**</sup>

与对照组比较: <sup>●</sup>*P*<0.05 <sup>●●</sup>*P*<0.01; 与模型组比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01; 与空白血浆组比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01; 与活性成分伍伍组比较: <sup>△</sup>*P*<0.05 <sup>△△</sup>*P*<0.01, 下同

<sup>●</sup>*P*<0.05 <sup>●●</sup>*P*<0.01 vs control group; <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs model group; <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs blank plasma group; <sup>△</sup>*P*<0.05 <sup>△△</sup>*P*<0.01 vs combination group of active components, same as below

### 3.4 单个活性成分、活性成分伍伍与黄芪-当归 1:1 配伍含药血浆对衰老 HSCs 细胞周期的影响

与对照组比较, 模型组和空白血浆组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞显著增多 (*P*<0.01), G<sub>2</sub>/M+S 期细胞显著减少 (*P*<0.01)。与模型组或空白血浆组比较, 阿魏

酸组、黄芪甲苷组、芒柄花素组、活性成分伍伍组和含药血浆组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞显著减少 (*P*<0.01), G<sub>2</sub>/M+S 期细胞显著增加 (*P*<0.01)。与活性成分伍伍组比较, 阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多 (*P*<0.05), G<sub>2</sub>/M+S 期细胞减少 (*P*<0.05), 而含药血浆组与活性成分伍伍组比较差异无统计学意义 (*P*>0.05)。结果见表 4。

### 3.5 单个活性成分、活性成分伍伍与芪归 1:1 配伍含药血浆对 Cyclin D1、CDK4 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组和空白血浆组 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达显著降低 (*P*<0.05)。与模型组比较, 阿魏酸组、芒柄花素组、黄芪甲苷组、活性成分伍伍组 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达显著增加 (*P*<0.05)。与活性成分伍伍组比较, 阿魏酸组、黄芪甲苷组、芒柄花素组、毛蕊异黄酮组和毛蕊异黄酮苷组 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达均显著降低 (*P*<0.05、0.01)。与空白血浆组比较, 含药血浆组 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达均显著增加 (*P*<0.05)。结果见表 5 和图 3。

## 4 讨论

HSCs 是机体造血系统的种子细胞, 具有很强的多向分化和自我更新潜能<sup>[1]</sup>。HSCs 及祖细胞增殖、分化是血细胞正常发育成熟、维持正常造血功

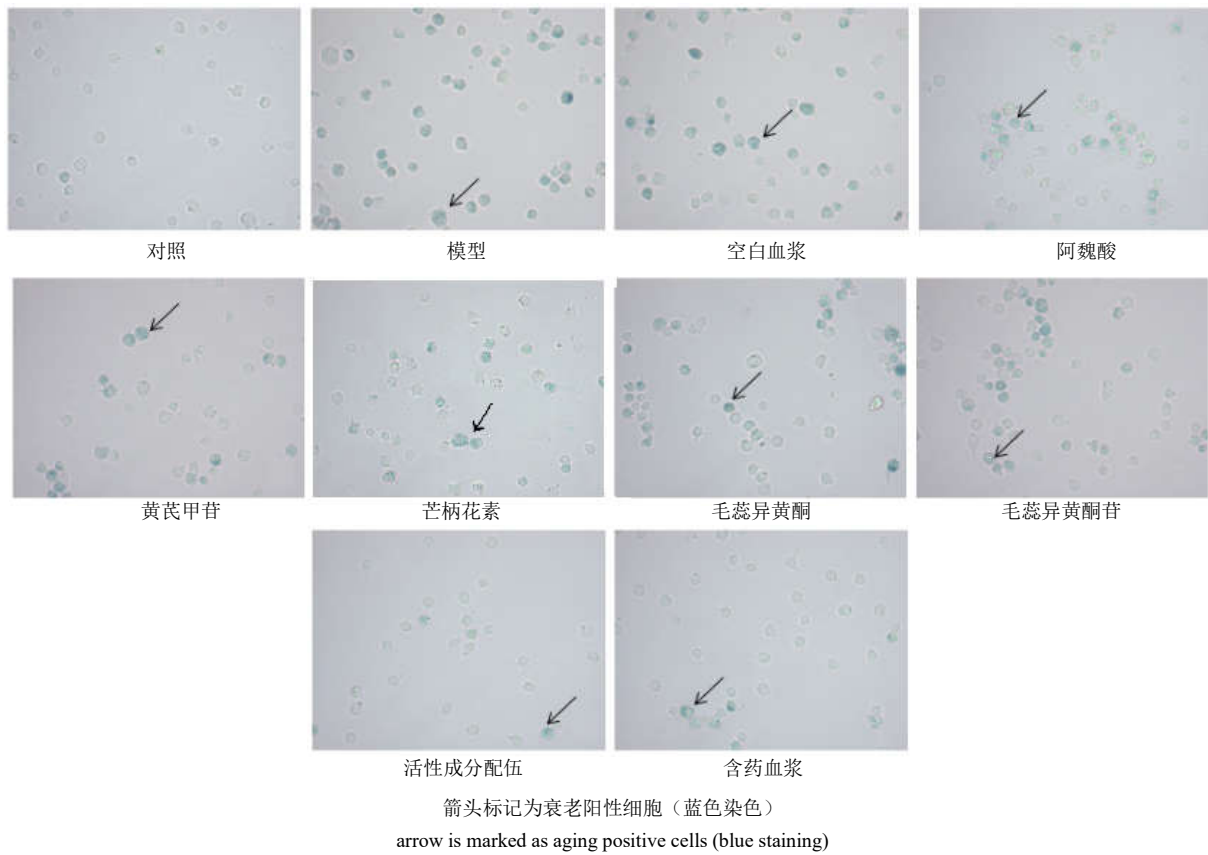


图 2 各组 HSCs 细胞 SA-β-Gal 染色 (×400)

Fig. 2 SA-β-Gal staining of HSCs cells in each group (×400)

表 4 各组 HSCs 细胞周期比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 4 Comparison of cell cycle of aging HSCs in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	细胞周期/%	
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M+S
对照	64.59 ± 1.71	35.41 ± 0.64
模型	85.92 ± 0.64 <sup>●●</sup>	14.08 ± 1.71 <sup>●●</sup>
空白血浆	84.55 ± 0.23 <sup>●●</sup>	15.45 ± 0.23 <sup>●●</sup>
阿魏酸	73.50 ± 4.50 <sup>☆☆△</sup>	26.50 ± 4.50 <sup>☆☆△</sup>
黄芪甲苷	80.01 ± 0.47 <sup>☆☆△△</sup>	19.98 ± 0.47 <sup>☆☆△△</sup>
芒柄花素	80.13 ± 0.74 <sup>☆☆△△</sup>	19.86 ± 0.74 <sup>☆☆△△</sup>
毛蕊异黄酮	82.69 ± 0.43 <sup>△△</sup>	17.30 ± 0.43 <sup>△△</sup>
毛蕊异黄酮苷	83.18 ± 0.32 <sup>△△</sup>	16.82 ± 0.32 <sup>△△</sup>
活性成分配伍	69.47 ± 0.45 <sup>☆☆</sup>	30.52 ± 0.45 <sup>☆☆</sup>
含药血浆	66.71 ± 2.10 <sup>★</sup>	33.29 ± 2.10 <sup>★</sup>

表 5 各组 Cyclin D1、CDK4 蛋白表达的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 5 Comparison of Cyclin D1 and CDK4 protein expression in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	Cyclin D1/β-actin	CDK4/β-actin
对照	0.577 ± 0.082	0.440 ± 0.148
模型	0.123 ± 0.017 <sup>●●</sup>	0.132 ± 0.078 <sup>●</sup>
空白血浆	0.170 ± 0.029 <sup>●●</sup>	0.195 ± 0.088 <sup>●</sup>
阿魏酸	0.453 ± 0.099 <sup>☆☆△</sup>	0.437 ± 0.051 <sup>☆☆△△</sup>
黄芪甲苷	0.433 ± 0.080 <sup>☆☆△</sup>	0.307 ± 0.073 <sup>☆☆△</sup>
芒柄花素	0.380 ± 0.069 <sup>☆☆△△</sup>	0.307 ± 0.033 <sup>☆☆△△</sup>
毛蕊异黄酮	0.200 ± 0.077 <sup>△</sup>	0.180 ± 0.048 <sup>△△</sup>
毛蕊异黄酮苷	0.197 ± 0.064 <sup>△</sup>	0.162 ± 0.021 <sup>△△</sup>
活性成分配伍	0.578 ± 0.046 <sup>☆☆</sup>	0.545 ± 0.037 <sup>☆☆</sup>
含药血浆	0.540 ± 0.098 <sup>★</sup>	0.557 ± 0.123 <sup>★</sup>

能的基础。机体衰老或者在放疗、化疗条件下均会引起 HSCs 老化, HSCs 老化的显著特征自我更新和增殖能力降低, 表现为衰老的 HSCs 向骨髓归巢能力下降, 自我更新能力减弱和分化功能异常, 细

胞增殖周期阻滞, 出现明显延迟的增殖反应, 从而表现出贫血、免疫功能衰退等造血系统衰老的特征性表现和肿瘤发生率增加、组织器官损伤难以修复等<sup>[10-11]</sup>。化疗、放疗和活性氧类 (ROS) 等多种因素是引起 HSCs 衰老和细胞周期停滞的重要原因。

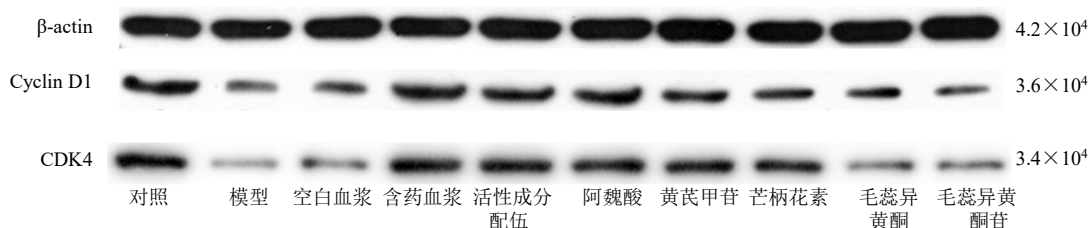


图 3 各组 Cyclin D1、CDK4 蛋白表达 Western blotting 检测图谱

Fig. 3 Pattern of Cyclin D1 and CDK4 protein expression detected by Western blotting in each group

目前认为, HSCs 老化的产生与多种机制有关, 其中 p53/p21 信号通路发挥了重要的作用。在应激条件下(如 DNA 损伤、缺氧和感染等)激活 p53, 导致 p21 高表达, p21 能抑制细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)激活, 引起细胞周期停止; 上调 p14 ARF 或 nutlin-3 引起 p53 激活和 p21 高表达可导致细胞老化<sup>[12]</sup>。SA- $\beta$ -Gal 染色是鉴定细胞衰老的重要方法, 且该方法仅会染色衰老细胞, 而衰老前细胞、静止期细胞以及肿瘤细胞都不会着色, 其实验结果较可靠, 不易被其他杂系细胞所干扰<sup>[13]</sup>。

以往采用血浆药理学方法, 研究了黄芪、当归配伍对衰老 HSCs 增殖的影响, 结果表明, 10% 的黄芪-当归配伍含药血浆可显著促进 HSCs 增殖, 而且以黄芪-当归 1:1 配伍的作用较强, 其机制与调节细胞周期有关<sup>[8]</sup>。大鼠肠吸收实验研究表明<sup>[9]</sup>, 黄芪-当归 1:1 时肠吸收主要成分是阿魏酸、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷和芒柄花素 5 种活性成分。因此, 在本实验中, 为进一步比较有效成分配伍是否具有黄芪-当归 1:1 配伍相似的促 HSCs 增殖的作用, 设立了黄芪-当归 1:1 配伍含药血浆, 并与空白血浆进行比较, 探讨含药血浆和有效成分配伍作用的异同。

本实验结果表明, 黄芪、当归活性成分阿魏酸、黄芪甲苷和芒柄花素可呈剂量依赖性地促进衰老 HSCs 增殖和延缓 HSCs 衰老, 为黄芪、当归抗 HSCs 衰老和促进细胞增殖的主要活性成分。而毛蕊异黄酮在 2.5~40.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、毛蕊异黄酮苷在 1.25~20.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对衰老 HSCs 无显著促增殖和降低细胞衰老率的作用。但正交试验研究表明, 毛蕊异黄酮或毛蕊异黄酮苷与阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素联合使用时, 可显著促进衰老的 HSCs 增殖, 降低细胞衰老率。表明毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷单独应用虽无促 HSCs 增殖和降低细胞衰老的作用, 但与 3 个主要有效成分配伍后可增强主要活性成分促细胞

增殖和降低细胞衰老的作用, 5 种成分配伍后对促进细胞增殖和抑制细胞衰老具有增效的作用。

在细胞周期中, 细胞周期 G<sub>1</sub> 期是细胞衰老的关键期间, 也是对其衰老控制的关键控制点。因此, 通过对 G<sub>1</sub> 期进行调控, 可改善细胞衰老。CDK4 是细胞周期调控的核心<sup>[14]</sup>, Cyclin D1 为正性调节因子, 细胞周期依赖性激酶抑制物 (CKI) 为负性调节因子<sup>[15]</sup>。P16 是 CKI 家族中的调节因子, 在 G<sub>1</sub> 期关键控制点发挥重要作用, 其机制是能与 CDK4 进行特异性结合, 阻止 Cyclin D1/CDK4 复合物的形成, 导致 Rb 蛋白磷酸化水平降低, 使细胞不可逆的停滞于 G<sub>1</sub> 期。Cyclin 是调控细胞周期的重要因素之一, 它作用于细胞周期的不同阶段, 引起细胞分裂、增殖, 加速细胞周期进程。在 Cyclin 家族中, Cyclin D 在细胞 G<sub>1</sub>/S 转换点中发挥着重要的作用, 其中 Cyclin D1 是 G<sub>1</sub> 期的特异性表达蛋白, 通过加速 G<sub>1</sub> 期的进程而缩短细胞周期<sup>[16]</sup>。CDK 处于细胞周期调控网络中的中心地位, 受细胞周期蛋白影响, CDK 主要是通过周期蛋白结合而正向调节细胞周期进程。不同的 Cyclin 识别并结合不同的 CDK, 组成不同的 Cyclin-CDK 复合体, 其中 CDK4 与 Cyclin D1 结合, 可通过将 Rb 蛋白磷酸化而使 Rb 蛋白失去对细胞周期的阻滞作用, 从而实现对细胞周期的推动和转化。本实验结果表明, 与对照组比较, 模型组和空白血浆组静止期 (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期) 细胞显著增多, 增殖期 (G<sub>2</sub>/M+S 期) 细胞显著减少, Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达显著降低。表明 HSCs 衰老时细胞周期蛋白表达下调, 使细胞周期进展阻滞。与模型组比较, 阿魏酸、芒柄花素、黄芪甲苷、活性成分配伍均可使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞显著减少, G<sub>2</sub>/M+S 期细胞显著增加, Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达显著增强。与空白血浆组比较, 黄芪-当归 1:1 配伍含药血浆组的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞也显著减少, G<sub>2</sub>/M+S 期细胞显著增加, Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达显著



增加。与活性成分配伍组比较,各活性成分单用组的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多, G<sub>2</sub>/M+S 期细胞减少, Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达均显著降低。而含药血浆组与活性成分配伍组比较无显著差异。表明阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素为黄芪当归配伍促 HSCs 增殖的主要药效物质,而次要成分毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷与主要成分配伍后可增强五种成分配伍后促 HSCs 增殖的作用,黄芪当归 1:1 配伍与 5 种活性成分配伍具有相同的促 HSCs 增殖的作用。这些结果说明,主要成分阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素和主要成分与次要成分毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷配伍,以及黄芪、当归配伍均能增加 Cyclin D1 和 CDK4 表达,从而促进了 Cyclin D1/CDK4 复合物的形成,促进了 HSCs 由 G<sub>1</sub> 期进入 S 期,实现对细胞周期的推动和转化。

本研究结果表明,黄芪和当归 1:1 配伍和其 5 种主要活性成分阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷配伍均可改善 HSCs 衰老,缩短细胞周期,促进 HSCs 增殖。5 种活性成分配伍具有增效作用。这可能是不同活性成分作用于 HSCs 增殖的不同环节,从而发挥增效作用。

#### 参考文献

- [1] Eaves C J. Hematopoietic stem cells: Concepts, definitions, and the new reality [J]. *Blood*, 2015, 125(17): 2605-2613.
- [2] Florian M C, Dörr K, Niebel A, *et al.* Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(5): 520-530.
- [3] Anthony B A, Link D C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells [J]. *Trends Immunol*, 2014, 35(1): 32-37.
- [4] Zhang W L, Zheng K Y, Zhu K Y, *et al.* Chemical and biological assessment of *Angelica* herbal decoction: Comparison of different preparations during historical applications [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(11): 1042-1048.
- [5] Li F, Tang R, Chen L B, *et al.* Effects of astragalus combined with angelica on bone marrow hematopoiesis suppression induced by cyclophosphamide in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(5): 598-609.
- [6] 陈凌波, 张珂胜, 黄小平, 等. 黄芪当归配伍对骨髓造血功能抑制小鼠造血祖细胞增殖的影响 [J]. *中草药*, 2016, 47(24): 4395-4400.
- [7] 黄小平, 李 菲, 陈凌波, 等. 黄芪和当归配伍对环磷酸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.
- [8] 张珂胜, 陈凌波, 黄小平, 等. 黄芪和当归配伍对小鼠造血干细胞衰老模型细胞增殖的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(21): 4187-4194.
- [9] 唐 蓉, 张依人, 陈叶童, 等. 不同剂量配伍对黄芪-当归中 5 种化学成分的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(23): 1-5.
- [10] Dykstra B, de Haan G. Hematopoietic stem cell aging and self-renewal [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 331(1): 91-101.
- [11] Dykstra B, Olthof S, Schreuder J, *et al.* Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(13): 2691-2703.
- [12] Villalonga-Planells R, Coll-Mulet L, Martínez-Soler F, *et al.* Activation of p53 by nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastomamultiforme [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18588.
- [13] Zhou Y, Yang B, Yao X, *et al.* Establishment of an aging model of Sca-1<sup>+</sup> hematopoietic stem cell and studies on its relative biological mechanisms [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2011, 47(2): 149-156.
- [14] Klement K, Goodarzi A A. DNA double strand break responses and chromatin alterations within the aging cell [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 329(1): 42-52.
- [15] Brenet F, Kermani P, Spektor R, *et al.* TGFβ restores hematopoietic homeostasis after myelosuppressive chemotherapy [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(3): 623-639.
- [16] 张先平, 王乾兴, 陈 斌. 当归多糖对小鼠衰老造血干细胞细胞周期蛋白的调控 [J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(3): 320-324.