

本文引用: 聂甜, 易琴, 徐荣华, 杨琳, 周欣欣, 郝敬全, 李擎虎. 调肝益血汤调控肝细胞 TPO 分泌对 IT 大鼠 CD34<sup>+</sup>造血干细胞向巨核细胞分化的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(6): 1008-1013.

## 调肝益血汤调控肝细胞 TPO 分泌对 IT 大鼠 CD34<sup>+</sup>造血干细胞向巨核细胞分化的影响

聂甜<sup>1</sup>, 易琴<sup>1\*</sup>, 徐荣华<sup>1</sup>, 杨琳<sup>1</sup>, 周欣欣<sup>1</sup>, 郝敬全<sup>1</sup>, 李擎虎<sup>2\*</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南长沙 410005

**[摘要]** **目的** 探讨调肝益血汤通过促进肝细胞产生血小板生成素(TPO)对免疫性血小板减少症(IT)大鼠骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞向巨核细胞分化的作用。**方法** 60 只 SD 大鼠按体质量分层为空白组(10 只, 等体积纯净水)和造模组(50 只)。造模组采用免疫抗 SD 大鼠血清法建立 IT 大鼠模型, 造模成功后根据随机数字表法分为模型组(等体积纯净水)、阳性对照组(3.6 mg/kg 地塞米松)及中药低、中、高剂量组(4.275、8.55、17.1 g/kg 调肝益血汤)。于造模成功后第 3 天开始灌胃。4 周后处死各组大鼠, 用光学显微镜检测总巨核细胞数量和产血小板型巨核细胞数量, HE 染色法检测肝细胞形态, 免疫组化染色法检测骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞, ELISA 检测血清和骨髓 TPO 浓度。**结果** 与空白组比较, 模型组骨髓总巨核细胞数、产血小板型巨核细胞数减少( $P<0.05$ ), 肝细胞数减少, 骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数减少( $P<0.05$ ), 血清和骨髓 TPO 浓度降低( $P<0.05$ )。与模型组比较, 阳性对照组和中药低、中、高剂量组骨髓总巨核细胞数、产血小板型巨核细胞数增多( $P<0.05$ ), 肝细胞数增多, 骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数增多( $P<0.05$ ), 血清和骨髓 TPO 浓度升高( $P<0.05$ )。与阳性对照组比较, 中药低剂量组骨髓总巨核细胞数、产血小板型巨核细胞数及骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数减少( $P<0.05$ ), 血清和骨髓 TPO 浓度降低( $P<0.05$ ); 中药高剂量组骨髓总巨核细胞数、产血小板型巨核细胞数及骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数增多( $P<0.05$ ), 血清和骨髓 TPO 浓度升高( $P<0.05$ )。与中药低剂量组比较, 中药中、高剂量组骨髓总巨核细胞数和产血小板型巨核细胞数及骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数增多( $P<0.05$ ), 血清和骨髓 TPO 浓度升高( $P<0.05$ )。与中药中剂量组比较, 中药高剂量组大鼠骨髓总巨核细胞数、产血小板型巨核细胞数及骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数增多( $P<0.05$ ), 血清和骨髓 TPO 浓度升高( $P<0.05$ )。**结论** 调肝益血汤可能通过调控肝细胞产生 TPO, 促进 IT 大鼠骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞向巨核细胞分化, 从而改善 IT 大鼠巨核细胞成熟障碍。

**[关键词]** 免疫性血小板减少症; 调肝益血汤; 血小板生成素; 造血干细胞; 巨核细胞

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.06.003

## Effects of Tiaogan Yixue Decoction on the differentiation of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells into megakaryocytes in IT rats by regulating the secretion of TPO in hepatocytes

NIE Tian<sup>1</sup>, YI Qin<sup>1\*</sup>, XU Ronghua<sup>1</sup>, YANG Lin<sup>1</sup>, ZHOU Xinxin<sup>1</sup>, HAO Jingquan<sup>1</sup>, LI Qinghu<sup>2\*</sup>

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of Tiaogan Yixue Decoction (TGYXD) on the differentiation of bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells into megakaryocytes in immune thrombocytopenia (IT) rats by promoting thrombopoietin (TPO) production in hepatocytes. **Methods** Sixty SD rats were stratified by body weight into a blank group (10 rats, receiving an equal

**[收稿日期]** 2024-12-17

**[基金项目]** 湖南省中医药管理局项目(B2023040); 湖南中医药大学校级重点课题项目(2022XYLH001)。

**[通信作者]** \* 李擎虎, 男, 副主任医师, E-mail: 357811614@qq.com; 易琴, 女, 主管护师, E-mail: 402292598@qq.com。

volume of purified water) and a modeling group (50 rats). The modeling group established the IT rat model using the serum method of rabbit anti-SD rats. After successful modeling, they were divided into a model group (equal volume of purified water), a positive control group (3.6 mg/kg dexamethasone), and low-, medium-, and high-dose groups of Chinese medicine (4.275, 8.55, 17.1 g/kg TGYXD, respectively) according to the random number table method. Gavage began on the third day after the successful modeling. After four weeks, the rats in each group were sacrificed. The total number of megakaryocytes and the number of platelet-producing megakaryocytes were determined by optical microscope. The morphology of hepatocytes was measured by HE staining. Bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells were examined by immunohistochemical staining. The concentrations of TPO in serum and bone marrow were determined by ELISA. **Results** Compared with the blank group, in the model group, the total number of bone marrow megakaryocytes and the number of platelet-producing megakaryocytes decreased ( $P<0.05$ ), the number of hepatocytes decreased, the number of bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells decreased ( $P<0.05$ ), and the concentrations of TPO in serum and bone marrow decreased ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, in the positive control group and the low-, medium-, and high-dose Chinese medicine groups, the total number of bone marrow megakaryocytes and the number of platelet-producing megakaryocytes increased ( $P<0.05$ ), the number of hepatocytes increased, the number of bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells increased ( $P<0.05$ ), and the concentrations of TPO in serum and bone marrow increased ( $P<0.05$ ). Compared with the positive control group, in the low-dose Chinese medicine group, the total number of bone marrow megakaryocytes, the number of platelet-producing megakaryocytes, and the number of bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells decreased ( $P<0.05$ ), and the concentrations of TPO in serum and bone marrow decreased ( $P<0.05$ ); in the high-dose Chinese medicine group, the total number of bone marrow megakaryocytes, the number of platelet-producing megakaryocytes, and the number of bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells increased ( $P<0.05$ ), and the concentrations of TPO in serum and bone marrow increased ( $P<0.05$ ). Compared with the low-dose Chinese medicine group, in the medium- and high-dose Chinese medicine groups, the total number of bone marrow megakaryocytes, the number of platelet-producing megakaryocytes, and the number of bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells increased ( $P<0.05$ ), and the concentrations of TPO in serum and bone marrow increased ( $P<0.05$ ). Compared with the medium-dose Chinese medicine group, in the high-dose Chinese medicine group, the total number of bone marrow megakaryocytes, the number of platelet-producing megakaryocytes, and the number of bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells increased ( $P<0.05$ ), and the concentrations of TPO in serum and bone marrow increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** TGYXD may promote the differentiation of bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells into megakaryocytes in IT rats by regulating the production of TPO in hepatocytes, thus alleviating the maturation disorder of megakaryocytes in IT rats.

[**Keywords**] immune thrombocytopenia; Tiaogan Yixue Decoction; thrombopoietin; hematopoietic stem cell; megakaryocyte

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, IT)是一种自身免疫性出血性疾病,特征表现为骨髓巨核细胞成熟障碍,外周血血小板数减少,皮肤紫癜<sup>[1]</sup>。造血干细胞向巨核细胞成熟障碍是IT血小板产生不足的主要原因,其具体发病机制已成为国际研究的重点<sup>[2]</sup>。肝细胞产生的血小板生成素(thrombopoietin, TPO)是机体最重要的内源性细胞因子,多数学者认为TPO在巨核细胞生成血小板过程中扮演重要角色,其促进了巨核祖细胞的增殖、巨核细胞的成熟,参与血小板的产生<sup>[3]</sup>。

IT中医病名为“紫癜病”,脏腑辨证是其重要的辨证方法,肝血虚为病理关键<sup>[4]</sup>。《灵枢·本神》认为,肝以生血,肝血化生肾精以充髓。正如叶天士在《本草经解·草部上·五味子》所说:“肝者敢也,以生血气之脏也。”现代医学证实,肝脏可以产生TPO,促进骨髓造血干细胞向巨核细胞分化,从而产生血小板,达到“生血”作用<sup>[5]</sup>。本研究团队在“肝生血”理论的

指导下,确立了调肝益血法,在张仲景小柴胡汤基础上遣方用药,形成调肝益血方,从肝细胞产生TPO调控造血干细胞分化切入,探讨其治疗IT的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠60只,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004,6~7周龄,体质量200~240 g。普通级新西兰兔6只,购于湖南太平生物科技有限公司,实验动物许可证号:SCXK(湘)2023-0011,自由进食、饮水,每天观察各组大鼠毛色、体温、饮水量、运动量、大便湿润度的变化。实验全程按照动物伦理学标准进行,获得湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准,批准号:ZYFY20221111-89。

## 1.2 实验药物

调肝益血汤中药材购于湖南中医药大学第一附属医院,组方:柴胡 12 g,黄芩 9 g,人参 9 g,白芍 10 g,熟地黄 10 g,生地黄 10 g,淫羊藿 10 g,大枣 9 g,巴戟天 10 g,甘草 6 g。调肝益血汤由湖南中医药大学第一附属医院制剂室用韩国东华 DHJ-02 煎药机制备。所有药物均用冷水浸泡 30 min,水煎煮 30 min,水煎浓缩成终浓度 1.71 g/mL,保存备用。醋酸地塞米松片(常乐制药有限责任公司,批号:D2403021,国药准字:H41020216,规格:0.75 mg×100片/瓶)。

## 1.3 实验试剂与仪器

瑞氏-吉姆萨染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号:413123);苏木素染色液、伊红染色液(生工生物工程上海股份有限公司,批号:607317-0100、E607321-0100);CD34 抗体(博奥森生物技术公司,批号:bs-8996R);羊抗兔 IgG(北京索莱宝科技有限公司,批号:SHB134);大鼠 TPO ELISA 试剂盒(睿信生物科技有限公司,批号:RX302163R)。

倒置显微镜(日本尼康有限公司,型号:Nikon Ci-S);病理切片机(德国徕卡有限公司,型号:RM2235);酶标仪(美国 Biotek 有限公司,型号:Synergy H4);KHB 科华生物洗板机(上海科华实验系统有限公司,型号:ST-36WT)。

## 1.4 IT 大鼠模型的建立与动物分组

60 只 SD 大鼠按体质量分层分为空白组(10 只)和造模组(50 只)。造模组根据兔抗 SD 大鼠血小板血清法建立 IT 大鼠模型<sup>[6]</sup>,取 SD 大鼠血小板悬液与 10 mL 弗氏完全佐剂等量混匀形成乳白色黏稠乳剂,向新西兰兔两后肢足垫及背部多点注射致敏,末次免疫后腹主动脉取血,获取兔抗 SD 大鼠血小板血清。SD 大鼠腹腔注射兔抗 SD 大鼠血小板血清造模,造模后血小板低于  $100 \times 10^9/L$ ,而白细胞和红细胞数均正常为造模成功<sup>[6]</sup>。造模成功后根据随机数字表法分为模型组、阳性对照组及中药低、中、高剂量组。中药组于造模成功后第 3 天灌胃给药,中药低、中、高剂量组大鼠灌胃量分别为 4.275、8.55、17.1 g/kg,1 次/d(均按常用实验动物和人的体表面积比值表折算成大鼠等效灌胃剂量<sup>[7]</sup>);模型组和空白组大鼠给予等体积的纯净水灌胃,1 次/d,连续灌胃 4 周;阳性对照组大鼠参照《成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国指南(2020 版)》<sup>[8]</sup>给予大剂量地塞米松连续冲击干预,每次灌胃 3.6 mg/kg,1 次/d,连续灌胃 4 d。

## 1.5 取材方法

(1)外周血采集:各组大鼠采用 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,腹主动脉采血 3 mL,EDTA 抗凝。(2)骨髓采集:剥离大鼠股骨,剪断两端,取骨髓做骨髓涂片,另用 PBS 冲洗骨髓腔,获取骨髓悬液。(3)肝脏剥离:麻醉后打开腹腔,取出完整肝脏,PBS 冲洗后将其固定在甲醛溶液中。

## 1.6 指标检测

1.6.1 光学显微镜检测大鼠巨核细胞数 取各组大鼠骨髓细胞涂片,晾干,置于染色台,加瑞氏染色液染色 10 min,沥干,加吉姆萨染色液染色 5 min,蒸馏水冲洗,晾干,普通光学显微镜下计数各组大鼠骨髓巨核细胞总数和产血小板型巨核细胞数。

1.6.2 HE 染色观察大鼠肝细胞形态 将大鼠肝组织放于标记编号的包埋盒中,常规梯度乙醇脱水,石蜡包埋,将切片置于 60 °C 烤箱烘烤 4 h,行 HE 染色进行病理观察。

1.6.3 免疫组化染色观察大鼠骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞形态 将抗原修复后的切片稍甩干后用免疫组化笔圈定玻片的待测组织区域,PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min。在圈定的区域内加 100  $\mu$ L/样本的 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温孵育 10 min。除去 PBS 溶液,用滤纸擦掉多余的溶液,加 100  $\mu$ L/样本封闭液,室温湿盒中孵育 1 h。除去封闭液,按 1:2 000 比例加一抗 CD34 抗体,4 °C 湿盒过夜。复温 30 min,除去一抗工作液,PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min,按 1:500 比例加二抗羊抗兔 IgG,室温湿盒中孵育 1 h。PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min。除去 PBS 溶液,用滤纸擦掉多余的溶液,加 100  $\mu$ L 新鲜配制的 DAB 显色液,室温孵育 3 min,干燥后,显微镜下进行视野采集。

1.6.4 ELISA 检测各组大鼠血清和骨髓 TPO 含量 设置标准品孔、空白孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50  $\mu$ L、空白孔加标本稀释液 50  $\mu$ L、样本孔中加入待测样本 50  $\mu$ L。除空白孔外,其他孔均加入 50  $\mu$ L 生物素化抗原,混匀,用封板膜封住反应孔,37 °C 温育 60 min,洗板。每孔加入 50  $\mu$ L 酶标亲和素,用封板膜封住反应孔,37 °C 孵育 30 min。洗板 5 次,用封板膜封住反应孔,37 °C 避光孵育 15 min。每孔加入 50  $\mu$ L 终止液,在 15 min 内,于 450 nm 波长处检测各孔的 OD 值。

## 1.7 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件分析数据。计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,所有资料进行正态性和方差齐性检验,若符合正态性和方差齐性,多组间比较采用单因素方差

分析,若不符合正态性和方差齐性,多组间比较采用非参数检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般情况变化

造模和干预期间,各组大鼠毛色、体温、饮水量、运动量、大便湿润度无显著变化,无死亡发生。

### 2.2 各组大鼠骨髓巨核细胞数比较

与空白组比较,模型组骨髓总巨核细胞数和产血小板型巨核细胞数减少( $P<0.05$ )。与模型组比较,阳性对照组和中药低、中、高剂量组骨髓总巨核细胞数及产血小板型巨核细胞数增多( $P<0.05$ )。与阳性对照组比较,中药低剂量组骨髓总巨核细胞数和产血小板型巨核细胞数减少( $P<0.05$ ),中药高剂量组骨髓总巨核细胞数和产血小板型巨核细胞数增多( $P<0.05$ )。与中药低剂量组比较,中药中、高剂量组骨髓总巨核细胞数和产血小板型巨核细胞数增多( $P<0.05$ )。与中药中剂量组比较,中药高剂量组骨髓总巨核细胞数和产血小板型巨核细胞数增多( $P<0.05$ )。详见表1。

### 2.3 各组大鼠肝细胞 HE 染色结果

空白组大鼠肝细胞形态正常,排列致密。模型组大鼠肝细胞数显著减少,细胞肿胀。阳性对照组和中药低、中、高剂量组大鼠肝细胞数均有不同程度增多。详见图1。

### 2.4 各组大鼠骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞免疫组化染色结果

与空白组比较,模型组骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞

表1 各组大鼠骨髓总巨核细胞数量和产血小板型巨核细胞数比较( $\bar{x}\pm s$ ,个, $n=10$ )

**Table 1** Comparison of the total number of megakaryocytes and the number of platelet-producing megakaryocytes in the bone marrow among different groups of rats ( $\bar{x}\pm s$ , individuals,  $n=10$ )

组别	总巨核细胞数	产血小板型巨核细胞数
空白组	1 123±121	561±35
模型组	228±35*	148±18*
阳性对照组	715±51 <sup>#</sup>	536±37 <sup>#</sup>
中药低剂量组	426±46 <sup>#△</sup>	298±24 <sup>#△</sup>
中药中剂量组	746±57 <sup>#▲</sup>	567±32 <sup>#▲</sup>
中药高剂量组	973±42 <sup>#▲●</sup>	801±36 <sup>#▲●</sup>

注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与阳性对照组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与中药低剂量组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ ;与中药中剂量组比较,<sup>●</sup> $P<0.05$ 。

数减少( $P<0.05$ )。与模型组比较,阳性对照组和中药低、中、高剂量组骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数增多( $P<0.05$ )。与阳性对照组比较,中药低剂量组骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数减少( $P<0.05$ ),中药高剂量组骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数增多( $P<0.05$ )。与中药低剂量组比较,中药中、高剂量组骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数增多( $P<0.05$ )。与中药中剂量组比较,中药高剂量组骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数增多( $P<0.05$ )。详见图2、表2。

### 2.5 各组大鼠血清和骨髓 TPO 浓度比较

与空白组比较,模型组血清和骨髓 TPO 浓度降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,阳性对照组和中药低、中、高剂量组血清和骨髓 TPO 浓度升高( $P<0.05$ )。与阳性对照组比较,中药低剂量组血清和骨髓 TPO

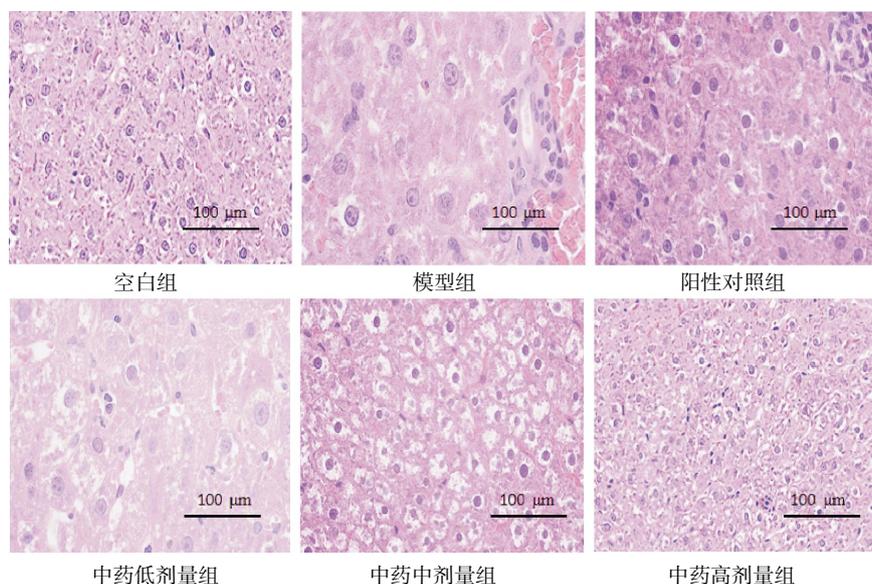


图1 各组大鼠肝细胞染色结果(HE,×400)

**Fig.1** Staining results of hepatocytes in each group of rats (HE, ×400)

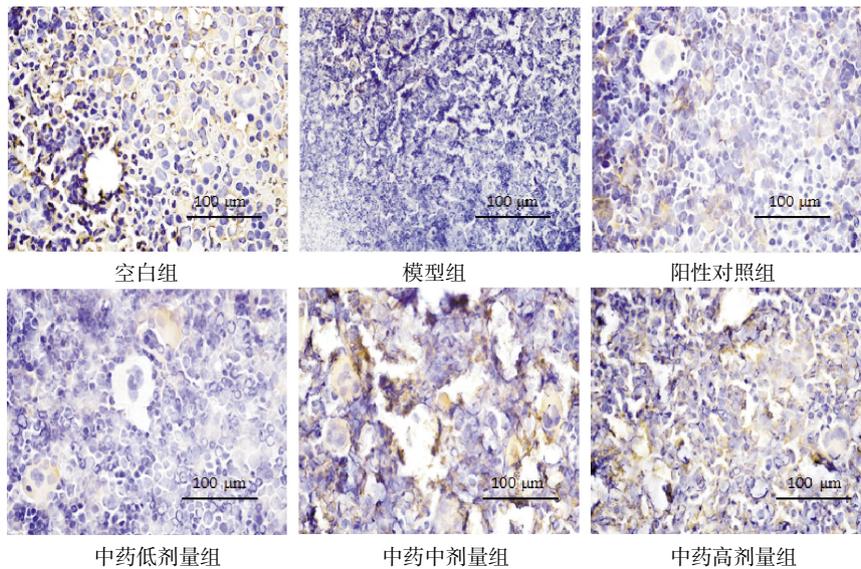


图2 各组大鼠骨髓造血干细胞 CD34<sup>+</sup>染色结果(免疫组化, ×400)

Fig.2 CD34<sup>+</sup> staining results of bone marrow hematopoietic stem cells of rats in each group (immunohistochemistry, ×400)

表2 各组大鼠骨髓 CD34<sup>+</sup>造血干细胞数比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Comparison of the number of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells in the bone marrow among different groups of rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	CD34 <sup>+</sup> 造血干细胞数/(个/HP)
空白组	226±21
模型组	47±5*
阳性对照组	137±14 <sup>#</sup>
中药低剂量组	97±12 <sup>#△</sup>
中药中剂量组	145±16 <sup>#▲</sup>
中药高剂量组	203±18 <sup>#△▲●</sup>

注:与空白组比较, \* $P<0.05$ ;与模型组比较, <sup>#</sup> $P<0.05$ ;与阳性对照组比较, <sup>△</sup> $P<0.05$ ;与中药低剂量组比较, <sup>▲</sup> $P<0.05$ ;与中药中剂量组比较, <sup>●</sup> $P<0.05$ 。

浓度降低( $P<0.05$ ), 中药高剂量组血清和骨髓 TPO 浓度升高( $P<0.05$ )。与中药低剂量组比较, 中药中、高剂量组血清和骨髓 TPO 浓度升高( $P<0.05$ )。与中药中剂量组比较, 中药高剂量组血清和骨髓 TPO 浓度升高( $P<0.05$ )。详见表 3。

### 3 讨论

IT 是一种抗血小板抗体致敏外周血血小板导致的自身免疫性出血性疾病<sup>[9-10]</sup>。低血小板计数对于 IT 紫癜形成至关重要, 血小板起源于骨髓巨核细胞, 抗血小板抗体诱导巨核细胞成熟障碍是其特性骨髓病理改变<sup>[11]</sup>。中医学认为 IT 属本虚标实之证, 涉及肝、脾、肾三脏<sup>[12]</sup>。肝脏的功能与血液的生成密切相关, 《灵枢·本神》提出“肝生血”的观点, 其机

表3 各组大鼠血清和骨髓 TPO 浓度比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Comparison of serum and bone marrow TPO concentrations among different groups of rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	血清 TPO 浓度/(pg/mL)	骨髓 TPO 浓度/(pg/mL)
空白组	23.16±1.08	42.43±3.13
模型组	5.03±0.11*	23.08±1.35*
阳性对照组	10.47±0.25 <sup>#</sup>	33.60±2.31 <sup>#</sup>
中药低剂量组	8.23±0.17 <sup>#△</sup>	29.29±1.22 <sup>#△</sup>
中药中剂量组	11.51±0.26 <sup>#▲</sup>	34.00±2.53 <sup>#▲</sup>
中药高剂量组	19.84±1.04 <sup>#△▲●</sup>	38.67±3.47 <sup>#△▲●</sup>

注:与空白组比较, \* $P<0.05$ ;与模型组比较, <sup>#</sup> $P<0.05$ ;与阳性对照组比较, <sup>△</sup> $P<0.05$ ;与中药低剂量组比较, <sup>▲</sup> $P<0.05$ ;与中药中剂量组比较, <sup>●</sup> $P<0.05$ 。

制与肝应春有促进、催生血液生成相关。《素问·六节藏象论篇》载:“肝者, 罢极之本, 魂之居也, 其华在爪, 其充在筋, 以生血气, 其味酸, 其色苍, 此为阳中少阳, 通于春气。”明确指出肝生血的论述, 正如柯琴在《伤寒论注·阳明脉证上》所说“精道由肾, 血道由肝”, 叶天士在《本草经解·草部上·五味子》所说“肝者敢也, 以生血气之脏也”。本研究团队在“肝生血”理论的指导下, 确立了调肝益血法, 在张仲景小柴胡汤基础上遣方用药, 形成调肝益血方。调肝益血方由柴胡、黄芩、人参、白芍、熟地黄、生地黄、淫羊藿、大枣、巴戟天、甘草组成。小柴胡汤有疏肝解郁之功效, 以此加白芍、熟地黄入肝经, 调肝益血, 体现补血以调肝柔肝为要; 其能促进少阳生发之气, 肝生血, 肾藏精, 养血生精, 精血相互资生, 则“余脏从之”, 加淫羊藿、巴戟天温肾益精血。因此, 全方调肝生血, 养肝

藏血,肝肾和合,以治IT。

IT患者血小板免疫性破坏,需要骨髓不断有巨核细胞驱动来维持血小板数量,此过程需要造血干/祖细胞进行刺激补充<sup>[13]</sup>。LIU等<sup>[14]</sup>对骨髓CD34<sup>+</sup>造血干细胞进行单细胞转录组分析,结果表明,IT患者中Lin-CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>造血干细胞数量减少,当与IT患者前B细胞与CD34<sup>+</sup>造血干细胞体外共培养时其向巨核细胞谱系分化受到影响。本研究结果发现,模型组IT大鼠骨髓造血干细胞CD34<sup>+</sup>染色表达率显著低于空白组,说明被动免疫状态下抗血小板抗体容易对CD34<sup>+</sup>造血干细胞造成损伤。经过低、中、高剂量调肝益血汤干预后,IT大鼠骨髓造血干细胞CD34<sup>+</sup>染色表达率均有不同程度的恢复,同时IT大鼠骨髓巨核细胞数均明显增加,表明调肝益血汤具有调控造血干细胞,促进巨核细胞分化的作用。

TPO是一种主要源自肝组织的泛造血细胞因子,其配体为血小板生成素受体,是I型细胞因子受体家族的成员,主要广泛表达于各种造血组织和细胞中。TPO从肝脏释放入血后与其受体特异性结合,从而激活受体,促进造血干/祖细胞自我更新和增殖,从而促进骨髓巨核细胞分化与增殖<sup>[15-16]</sup>。已有研究表明,TPO基因敲除的动物血小板数量降低,巨核细胞系集落生成细胞仅为正常数量的5%~10%<sup>[17]</sup>。本研究结果表明,与空白组相比,模型组IT大鼠造模后肝细胞数量显著减少,同时血清、骨髓TPO浓度显著降低,提示抗血小板抗体容易造成大鼠肝细胞坏死,引起TPO分泌减少,这可能是IT大鼠CD34<sup>+</sup>造血干细胞不能向巨核细胞分化的原因之一。给予各剂量调肝益血汤干预后,IT大鼠肝细胞数量均不同程度增加,同时IT大鼠血清、骨髓TPO浓度均显著增加,这说明调肝益血汤具有促进肝细胞分泌TPO,促进改善骨髓造血干细胞向巨核细胞分化的作用。

综上所述,肝细胞产生的TPO对促进IT大鼠骨髓造血干细胞向巨核细胞分化具有重要作用。调肝益血汤可以促进骨髓CD34<sup>+</sup>造血干细胞向巨核细胞分化,其机制可能与促使肝细胞产生TPO有关。调肝益血可能是IT重要的中医治法,本课题组将进一步从TPO信号下游机制探索调肝益血汤干预IT的分子机制。

## 参考文献

[1] WEITZ I C, LIEBMAN H A. Complement in immune thrombocytopenia (ITP): The role of complement in refractory ITP[J].

British Journal of Haematology, 2023, 203(1): 96-100.

- [2] LV Y, SHI H P, LIU H, et al. Current therapeutic strategies and perspectives in refractory ITP: What have we learned recently?[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 953716.
- [3] SUN Y Y, TONG H, CHU X, et al. Notch1 regulates hepatic thrombopoietin production[J]. Blood, 2024, 143(26): 2778-2790.
- [4] 彭名行, 黄礼明, 朱国庆, 等. 从“肝者, 凝血之本”探讨原发性血小板减少症的病机与论治思路[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(7): 3537-3540.
- [5] GALLO P, TERRACCIANI F, DI PASQUALE G, et al. Thrombocytopenia in chronic liver disease: Physiopathology and new therapeutic strategies before invasive procedures[J]. World Journal of Gastroenterology, 2022, 28(30): 4061-4074.
- [6] 聂甜, 蒋文明, 彭素娟, 等. 大鼠原发性免疫性血小板减少性紫癜热盛模型的建立与评价[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(5): 13-19.
- [7] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1692.
- [8] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组. 成人原发性免疫性血小板减少症诊断与治疗中国指南(2020版)[J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(8): 617-622.
- [9] ZITEK T, WEBER L, PINZON D, et al. Assessment and management of immune thrombocytopenia (ITP) in the emergency department: Current perspectives[J]. Open Access Emergency Medicine, 2022, 14: 25-34.
- [10] LIU X G, HOU Y, HOU M. How we treat primary immune thrombocytopenia in adults[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2023, 16(1): 4-15.
- [11] MADKHALI M A. Recent advances in the management of immune thrombocytopenic purpura (ITP): A comprehensive review[J]. Medicine, 2024, 103(3): e36936.
- [12] 张亚萌, 曹小勇. 浅析免疫性血小板减少症的中医认识及治疗[J]. 中医临床研究, 2022, 14(26): 31-33.
- [13] HERD O J, RANI G F, HEWITSON J P, et al. Bone marrow remodeling supports hematopoiesis in response to immune thrombocytopenia progression in mice[J]. Blood Advances, 2021, 5(23): 4877-4889.
- [14] LIU Y, ZUO X Y, CHEN P, et al. Deciphering transcriptome alterations in bone marrow hematopoiesis at single-cell resolution in immune thrombocytopenia[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2022, 7(1): 347.
- [15] OHSAKA A, HIROTA-KOMATSU S, ARAKI M, et al. Platelet-derived growth factor receptors form complexes with neuropilin-1 during megakaryocytic differentiation of thrombopoietin-dependent UT-7/TPO cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 459(3): 443-449.
- [16] TOBIAS L, ELIAS-ASSAD G, KHAYAT M, et al. Long-term outcome of patients with TPO mutations[J]. Journal of Clinical Medicine, 2021, 10(17): 1-9.
- [17] RANI G F, PREHAM O, ASHWIN H, et al. Dissecting pathways to thrombocytopenia in a mouse model of visceral leishmaniasis[J]. Blood Advances, 2021, 5(6): 1627-1637.

(本文编辑 周旦)