

地榆皂苷 I 基于自噬升高白细胞作用研究

熊永爱, 邹 娅, 张德华, 陈 梦, 邓从玲, 王 森*

遵义医学院药学院 药剂学教研室, 贵州 遵义 563000

摘要: **目的** 研究地榆皂苷 I (ZgI) 升高外周血液中白细胞数量的作用机制。**方法** 昆明种小鼠按体重随机分为对照组、模型组、3-甲基腺苷 (3-MA) 组、ZgI (20 mg/kg) 组、ZgI (20 mg/kg) + 3-MA 组。实验第 1 天以 120 mg/kg 剂量 ip 环磷酰胺诱导小鼠骨髓抑制模型并 ig 给药, 连续给药 6 d。实验第 6 天采用全自动血球计数仪测定小鼠血液中白细胞和中性粒细胞数量; 采用透射电镜和免疫荧光显微镜观察造血干细胞自噬程度; 流式细胞仪测定造血干细胞凋亡率; Western blotting 法检测 Atg5、Atg7 和 Beclin-1 蛋白表达水平。**结果** 与模型组和 3-MA 组比较, ZgI 可显著升高骨髓抑制小鼠白细胞数量 ($P < 0.05$) 和中性粒细胞数量 ($P < 0.05$), 激发其造血干细胞自噬的发生, 并显著上调造血干细胞中 Atg5、Atg7 和 Beclin-1 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$)。**结论** ZgI 是一种高效的自噬激活剂, 其升高白细胞机制可能与促进骨髓抑制小鼠造血干细胞自噬有关。

关键词: 地榆皂苷 I; 骨髓抑制; 造血干细胞; 自噬; 白细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)14-3350-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.022

Promotion of Ziyuglycoside I on white blood cells by autophagy pathway

XIONG Yong-ai, ZOU Ya, ZHANG De-hua, CHEN Meng, DENG Cong-ling, WANG Sen

School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Abstract: **Objective** To study the mechanism of ziyuglycoside I (ZgI) increasing the number of white blood cells (WBC) in peripheral blood. **Methods** KM mice were randomly divided into control group, model group, 3-methyladenosine (3-MA) group, ZgI group (20 mg/kg), and ZgI (20 mg/kg)+3-MA group. On the first day of experiment, myelosuppression mice were induced by ip cyclophosphamide of 120 mg/kg and were continuously gavaged with ZgI for 6 d. On the 6th day, the number of WBC and granulocytes were determined. The degree of hematopoietic stem cells (HSCs) autophagy was observed by transmission electron microscopy and immunofluorescence microscopy. The apoptosis rate of HSCs was determined by flow cytometry, and the expression of Atg5, Atg7, and Beclin-1 proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group and 3-methyladenine group, ZgI significantly increased the numbers of leukocyte and granulocytes ($P < 0.05$), it also significantly stimulated the autophagy of HSCs. Meanwhile, ZgI significantly up-regulated the Atg5, Atg7, and Beclin-1 ($P < 0.01$) proteins expression in HSCs. **Conclusion** The results suggested that ZgI was an efficient autophagic activator, and the mechanism of increasing WBC might be related to the promotion of HSCs autophagy of myelosuppression mice.

Key words: ziyuglycoside I; myelosuppression; hematopoietic stem cells; autophagy; white blood cells

骨髓抑制是肿瘤放、化疗对血液系统的毒性反应之一, 是限制放、化疗广泛应用和疗效发挥的重要因素。如何有效保护或重建骨髓造血功能、提升外周血中白细胞 (WBC) 的数量, 是放、化疗顺利开展的关键, 对于肿瘤的治疗和提高患者的生存质量具有重要意义。放、化疗诱导造血干细胞 (HSCs) 损伤, 进而破坏其增殖和分化能力是骨髓抑制的病

理基础, 但其确切的发生机制仍未明确。因此, 研究和揭示骨髓抑制的发生机制仍然是开发保髓升白药物需要解决的首要问题。

研究显示, 自噬是真核细胞在营养匮乏、缺氧及放化疗损伤等不利刺激下, 维持细胞基本生命活动和内环境稳定的适应机制^[1]。近年来, 自噬与肿瘤、神经退行性疾病、心脑血管疾病、糖尿病、免

收稿日期: 2017-10-24

基金项目: 贵州省中医药管理局项目 (Q2YY-2016-016); 遵义医学院博士启动基金 (F808); 遵义市市校联合基金项目 [遵市科合社字 (2017) 19 号]

作者简介: 熊永爱 (1985—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然产物与免疫药理。Tel: (0851)28642515 E-mail: xya180@sina.com

*通信作者 王 森, 教授, 硕士生导师。E-mail: wangsen912912@qq.com

疫及自身免疫疾病等的相关性已成为研究热点^[2]。自噬在 HSCs 的特性维持和增殖分化调节中也发挥了重要作用,是放、化疗损伤时 HSCs 的促生存机制^[3]。HSCs 的特性(自我更新、多潜能性、分化和静息状态)^[4-6]与自噬密切相关,同时细胞保护性自噬还能提高 HSCs 对电离辐射的耐受能力^[7]。

地榆皂苷(ziyuglycoside)为本课题组研究多年的用于对抗骨髓抑制的天然产物,是地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 发挥升高 WBC 作用的主要物质基础^[8-9],能够有效地保护骨髓^[10-11],有望被开发成为预防和治疗骨髓抑制的药物。

本实验以自噬在 HSCs 功能维持过程中的作用为切入点,探究地榆皂苷 I (ziyuglycoside I, ZgI) 是否可通过干预化疗环境下 HSCs 自噬来升高外周血 WBC,同时阐释 ZgI 骨髓升白的作用机制,为其创新药物开发提供方向和依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级昆明种小鼠,体质量 18~22 g,雌雄各半,购自成都达硕生物科技有限公司,实验动物许可证号 SYXK(川)2015-085。

1.2 药品与试剂

地榆饮片(批号 20170213),购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,经遵义医学院药学院生药学教研室吴发明副教授鉴定为蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 的干燥根;ZgI,实验室自制;3-甲基腺苷(3-MA),南京安培化工科技有限公司;环磷酰胺(CTX,批号 20131203),齐鲁制药有限公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Atg7、LC3、Atg5、Beclin-1、Alexa 488、CD34⁺抗体购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

H-600IV 型透射电镜(日本日立公司);SZX16 型荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);Power PAC 200 型垂直式电泳仪、Image Lab 型凝胶分析系统(美国 Bio-Rad 公司);COULTER EPICS-XL 型流式细胞仪(美国 Coulter 公司);KX-21 型全自动血液分析仪(日本 Sysmex 公司);MK3 型多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 仪器有限公司)。

2 方法

2.1 ZgI 的制备

取地榆饮片 1 kg,适当粉碎后加 8 倍量 90%乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并 2 次提取

液,静置放冷后,加 10%的 NaOH 溶液调 pH 值至 12~14,静置过夜,离心去沉淀,滤液抽滤得到上清液。上清液减压浓缩至适当体积,加水适量至乙醇体积分数约 20%,用 10% NaOH 溶液调 pH 值至 11~12,静置 12 h,离心收集沉淀。上清用 10% NaOH 溶液调 pH 值至 12~13,静置 12 h,离心收集沉淀。合并 2 次沉淀,70 °C 减压至干,用无水乙醇回流 45 min,滤过,收集滤液,减压回收乙醇至有固形物析出,挥干,所得固形物于 70 °C 减压干燥 12 h,即得(经 HPLC 检测,ZgI 质量分数>98%)。

2.2 分组及给药

小鼠适应性喂养 1 周后按体质量随机分为对照组、模型组、3-MA 组、ZgI 组、ZgI+3-MA 组,每组 10 只。自实验第 1 天开始,ZgI 组和 ZgI+3-MA 组小鼠按 20 mg/kg 剂量(根据预试验确定)ig 给予 ZgI 溶液(0.5% CMC-Na 溶液溶解),对照组、模型组和 3-MA 组小鼠 ig 等体积 0.5% CMC-Na 溶液,每日 1 次,连续给药 6 d。实验第 1、4 天 3-MA 组和 ZgI+3-MA 组小鼠尾 iv 3-MA 生理盐水溶液(1 mg/kg)。

2.3 小鼠骨髓抑制模型制备

实验第 1 天,除对照组外,其余各组小鼠按 120 mg/kg 剂量 ip CTX 生理盐水溶液,对照组小鼠 ip 等体积生理盐水。实验第 6 天,各组小鼠眼眶取血,用装有抗凝剂 EDTA-Na₂ 的 EP 管收集,待测。断颈处死小鼠,取左右侧股骨和胫骨,除净肌肉和结缔组织,生理盐水冲洗,75%乙醇中浸泡 2 min,用无菌眼科小剪在上端剪口,用 5 mL 注射器抽取适量生理盐水注入股骨骨髓腔,冲洗 2~3 遍,将骨髓细胞液注入 DEPC 水处理过的 EP 管中,放置于液氮中快速冷冻,转移至-80 °C 超低温冰箱保存待测。

2.4 检测指标

2.4.1 小鼠外周血中 WBC 和中性粒细胞计数 采用全自动血球计数仪对各实验组小鼠外周血 WBC 和中性粒细胞进行计数。

2.4.2 HSCs 分离及透射电镜观察 取骨髓细胞悬液,加入淋巴细胞分离液分离骨髓单核细胞。采用造血干/祖细胞(HSPCs)最常见标志物 CD34⁺鉴定及分选干细胞:向骨髓单核细胞中加入 30 μL 正常小鼠血清以封闭非特异结合位点,加入 10 μL FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD34⁺抗体,对照管加入 10 μL 对照抗体,4 °C 避光反应 30 min。按 60 μL/mL 加入磁性胶体,4 °C 孵育 15 min。将免疫标记的骨髓

细胞悬液转移至免疫磁性系统中, 过 Stemsep 分离柱分离, 收集分离出的细胞。所得细胞用 3%戊二醛固定 3 h, 再用 1%锇酸固定 1 h, 50%~90%的丙酮梯度脱水, Epon812 包埋。取包埋块进行薄切片, 甲苯胺蓝染色, 光镜下半薄定位后进行超薄切片, 醋酸铀和枸橼酸铅双染色, 透射电镜下观察各实验组 HSCs 自噬情况。

2.4.3 免疫荧光检测 LC3 表达水平 取上述分离的 HSCs, PBS 洗涤 2 次, 每次 5 min。4%多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用 10% BSA 封闭后加入 LC3 一抗 (1:1 000), 4 ℃孵育 8 h。将玻片置于 PBS (pH 7.4) 中, 脱色摇床晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。稍甩干后在圈内滴加二抗 Alexa 488 (1:500), 室温孵育 50 min。PBS 洗 3 次, 每张切片滴加 50~100 μ L DAPI 染液, 室温孵育 5 min。PBS 洗涤后, 于荧光显微镜下观察并拍照, MicroPublisher 图像分析软件进行荧光强度值分析。

2.4.4 细胞凋亡检测 采用凋亡试剂盒进行避光染色后, 各组小鼠 HSCs 用 PBS 洗涤, 0.25%胰酶消化, 用移液枪轻轻吹打、悬浮。收集细胞于流式管中, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。沉淀细胞用 300 μ L 的 Binding buffer 重悬, 再加入 5 μ L Annexin V-FITC, 混匀后避光孵育 10 min, 加入 5 μ L PI, 混匀后避光孵育 5 min。1 h 内上机检测, Expo32ADC 软件进行免疫荧光数据分析, 以亚二倍体峰代表细胞凋亡峰计算 HSCs 凋亡率。

2.4.5 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白表达水平 取各组小鼠 HSCs, 细胞裂解法提取总蛋白, Lowry 法蛋白定量, SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, Western blotting 法检测蛋白表达水平。应用全自动数码凝胶成像系统成像, 使用 Scion Image 软件对蛋白电泳带进行灰度值分析, 以 β -actin 作为内参计算 Atg5、Atg7 和 Beclin-1 蛋白的相对表达量。

2.5 统计学处理

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用单因素方差分析, 方差齐者组间进行 LSD 检验, 方差不齐者进行 Tamhane's T2 检验。

3 结果

3.1 ZgI 对骨髓抑制小鼠 WBC 和中性粒细胞数量的影响

由表 1 可知, 与对照组比较, 模型组小鼠外周

表 1 ZgI 对骨髓抑制小鼠 WBC 和中性粒细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of ZgI on WBC and neutrophil of myelosuppression mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	WBC/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	中性粒细胞/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
对照	—	6.68 $\pm$ 0.74	5.57 $\pm$ 0.46
模型	—	2.24 $\pm$ 0.29 [#]	2.58 $\pm$ 0.33 [#]
3-MA	1	1.25 $\pm$ 0.46 [#]	1.71 $\pm$ 0.29 [#]
ZgI	20	5.85 $\pm$ 0.18 ^{*△}	4.71 $\pm$ 0.82 ^{*△}
ZgI+3-MA	20+1	4.18 $\pm$ 0.32 ^{*△}	3.10 $\pm$ 0.25 ^{*△}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 3-MA 组比较: [△] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs 3-MA group

血 WBC 和中性粒细胞数量显著减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, ZgI 组和 ZgI+3-MA 组小鼠外周血 WBC 和中性粒细胞数量均显著增加 ($P < 0.05$); 与 3-MA 组比较, ZgI 组和 ZgI+3-MA 组小鼠外周血 WBC 和中性粒细胞数量均显著增加 ($P < 0.05$); 表明 ZgI 可显著升高 HSCs 自噬抑制状态下小鼠外周血 WBC 数量。

3.2 ZgI 对骨髓抑制小鼠 HSCs 自噬的影响

由图 1 可见, 模型组小鼠 HSCs 可见少量自噬体及凋亡小体 (图中箭头所示), 表明 CTX 作用后, 模型组小鼠 HSCs 大量死亡, 仅少量存活细胞发生自噬。与模型组比较, 在 3-MA 作用下, HSCs 自噬进一步减少。ZgI 作用后, 小鼠 HSCs 自噬体及凋亡小体明显增多, 表明 ZgI 可显著对抗 CTX 和 3-MA 引起的 HSCs 自噬抑制。

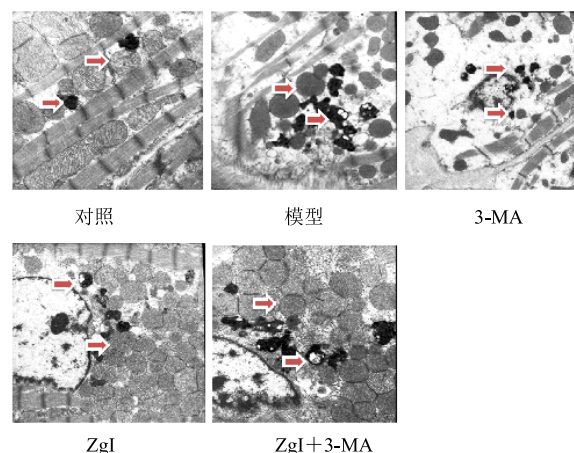


图 1 ZgI 对骨髓抑制小鼠 HSCs 自噬的影响

Fig. 1 Effect of ZgI on autophagy of HSCs of myelosuppression mice

3.3 ZgI 对骨髓抑制小鼠 HSCs 自噬相关蛋白 LC3 表达的影响

由图 2、3 可知,与对照组比较,模型组和 3-MA 组小鼠 HSCs 中 LC3 荧光值显著降低 ($P < 0.05$);与模型组和 3-MA 组比较,ZgI 和 ZgI+3-MA 组小鼠 HSCs 中 LC3 荧光值均显著升高 ($P < 0.01$)。

3.4 ZgI 对骨髓抑制小鼠 HSCs 凋亡的影响

由图 4、5 可知,与对照组比较,模型组和 3-MA 组小鼠 HSCs 凋亡率显著增加 ($P < 0.01$);与模型组和 3-MA 组比较,ZgI 和 ZgI+3-MA 组小鼠 HSCs 凋亡率显著减少 ($P < 0.01$),提示 ZgI 可显著抑制骨髓抑制和自噬抑制状态下小鼠 HSCs 凋亡。

3.5 ZgI 对骨髓抑制小鼠 HSCs 中 Atg5、Atg7 和 Beclin-1 蛋白表达的影响

由图 6 可知,与模型组和 3-MA 组比较,ZgI 和 ZgI+3-MA 组小鼠 HSCs 中 Atg5、Atg7 和 Beclin-1 蛋白表达均显著增加 ($P < 0.01$)。提示 ZgI 可显著上调骨髓抑制状态下小鼠 HSCs 自噬关键调控蛋白的表达。

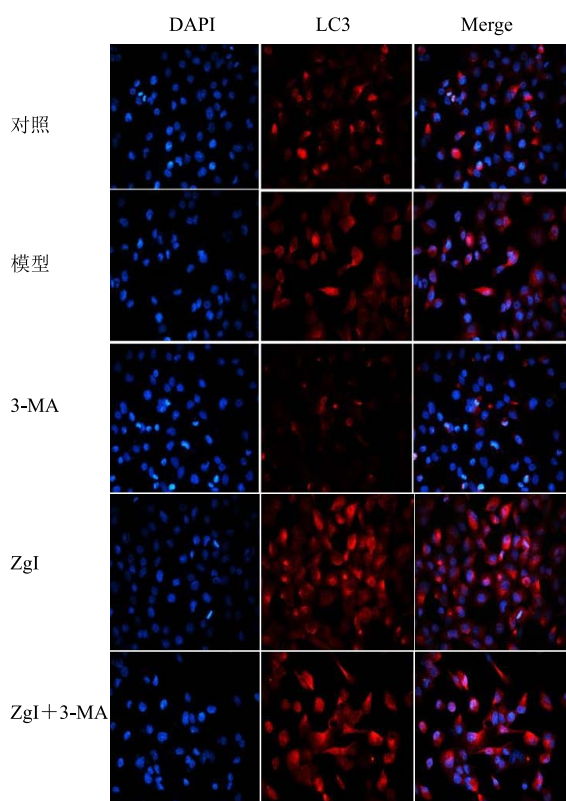
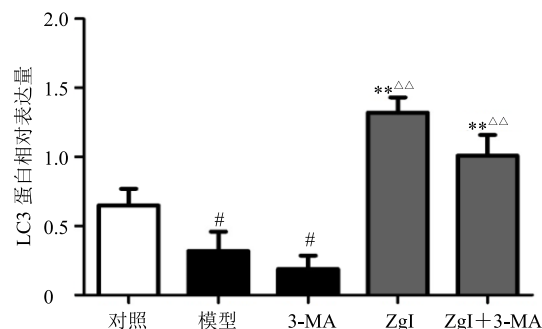


图 2 各组小鼠 HSCs 中 LC3 免疫荧光检测

Fig. 2 Immunofluorescence detection of LC3 in HSCs of mice in each group



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与 3-MA 组比较: △△ $P < 0.01$, 图 6 同

$P < 0.05$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group; △△ $P < 0.01$ vs 3-MA group, same as Fig.6

图 3 ZgI 对骨髓抑制小鼠 HSCs 自噬相关蛋白 LC3 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of ZgI on expression of LC3 protein in HSCs of myelosuppression mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

本课题组在前期研究中发现,临床常用化疗药物诱发的小鼠骨髓抑制均表现出共同特点,即 WBC 几乎都表现为“先降低(1~6 d),然后代偿性升高(7~10 d),再持续降低(11~18 d)”的动态变化规律。为了对这一现象进行合理解释,本课题组对放、化疗损伤后 HSCs 的自我更新和定向分化做了大量文献调研,从细胞的内源性机制和外源微环境对已有研究和假说(HSCs DNA 损伤^[12]、端粒功能障碍^[13]、活性氧^[14]、细胞极性丢失^[15]、造血微环境破坏^[16]等)进行系统分析,然而都未能得到合理的解释。目前国内外研究证实,在未采取任何干预措施的前提下,放、化疗对 HSCs 造成的 DNA 损伤、端粒功能障碍、氧化应激损伤、细胞极性丢失、造血微环境破坏等都是不可逆的过程,一旦 HSCs 发生不可逆损伤,下游的 WBC 会持续减少,直至放、化疗停止后某一时间段才会恢复正常,显然与本课题组前期得到的实验结果不符。由此可见,从现有的研究成果中无法获得解释。于是推测,骨髓抑制发生过程中,HSCs 内部可能还存在某种调控机制,干预了其特性的维持和增殖、分化,从而对下游 WBC 产生了影响。在细胞自噬干预 HSCs 功能维持和定向分化研究领域,本课题组对国内外近 10 年的研究报道调研发现,自噬在 HSCs 向 B 细胞^[17]、T 细胞^[18]、NK 细胞^[19]、红细胞^[20]、巨噬细胞^[21]等分化过程中的影响及其机制已有了初步揭示,而在粒细胞和血小板谱系分化过程中的作用机制尚未得

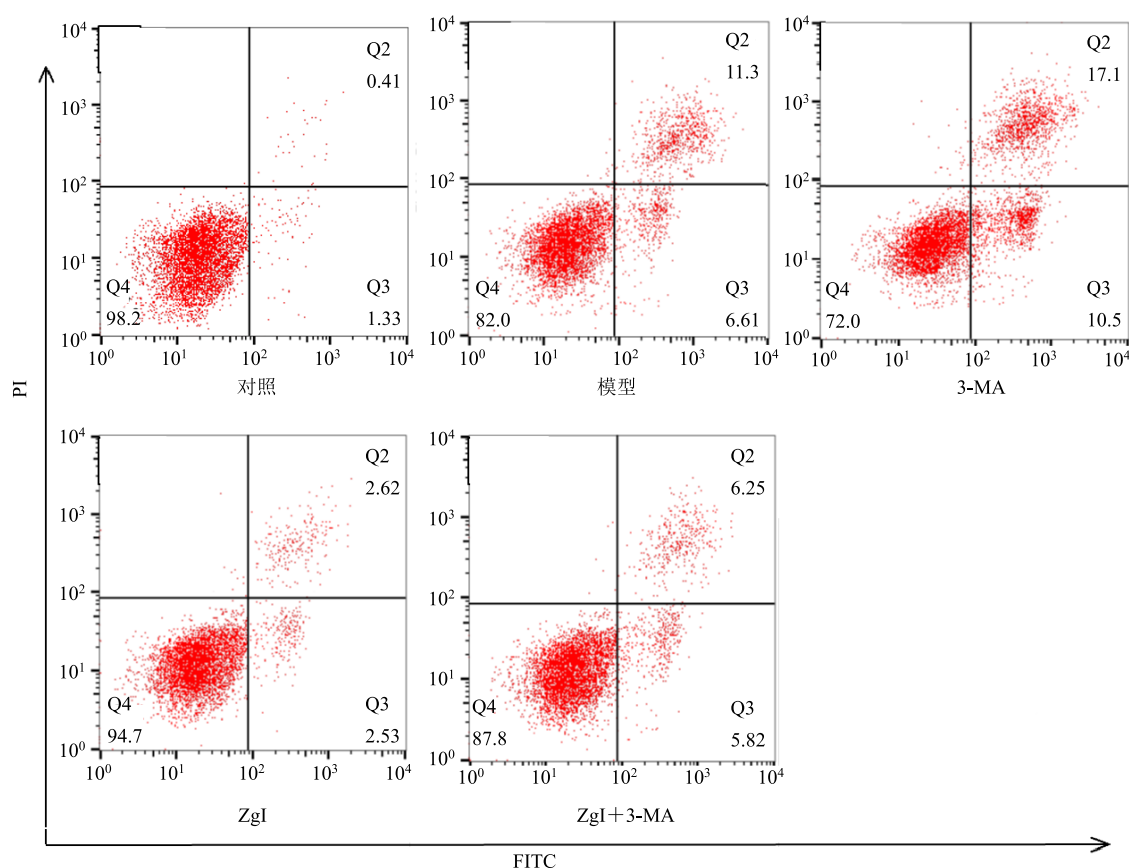
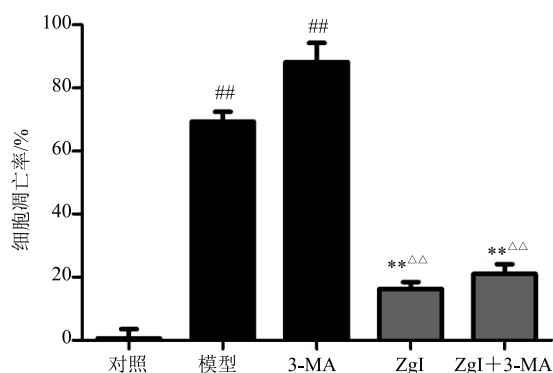


图 4 ZgI 对骨髓抑制小鼠 HSCs 凋亡的影响

Fig. 4 Effect of ZgI on apoptosis of HSCs of myelosuppression mice



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$; 与 3-MA 组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{**}P < 0.01$ vs model group; $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs 3-MA group

图 5 ZgI 对骨髓抑制小鼠 HSCs 凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 5 Effect of ZgI on apoptosis rate of HSCs of myelosuppression mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

到揭示。在对粒细胞分化影响的研究中,也仅仅是阐述了 Atg7 基因的缺失对粒细胞功能的影响^[22]。现有研究证明自噬在 HSCs 分化过程中的细胞重塑

及其多潜能性表现中扮演着重要的角色。但 HSCs 自噬对放化疗后 WBC 变化(增殖、分化、凋亡、细胞形态及功能)影响机制仍不清楚,而 WBC 又跟骨髓抑制的发病机制紧密联系,因此,本研究期望探明自噬介导 HSCs 定向分化的信号转导机制,填补上述研究空白。

HSCs 是下游血细胞的根本来源,一旦造血池枯竭,下游血细胞也不复存在。因此 HSCs 的生命力是下游血细胞产生的根本保障。本实验结果表明,CTX 作用后,小鼠骨髓 HSCs 大量凋亡,外周血液中 WBC 和中性粒细胞也显著下降。进一步采用 3-MA 抑制其自噬后, HSCs 凋亡更加严重,外周血液中 WBC 和中性粒细胞下降更加显著,因此可以证明自噬对于 HSCs 维持生命力具有重要作用。采用 ZgI 干预后,无论是 CTX 还是 3-MA 作用后,小鼠 HSCs 的自噬作用都得到促进,下游 WBC 和中性粒细胞也显著回升,说明 ZgI 通过促进 HSCs 自噬提升 WBC 这一假说基本成立。在此基础上,采用透射电镜和免疫荧光对各实验组小鼠 HSCs 自噬

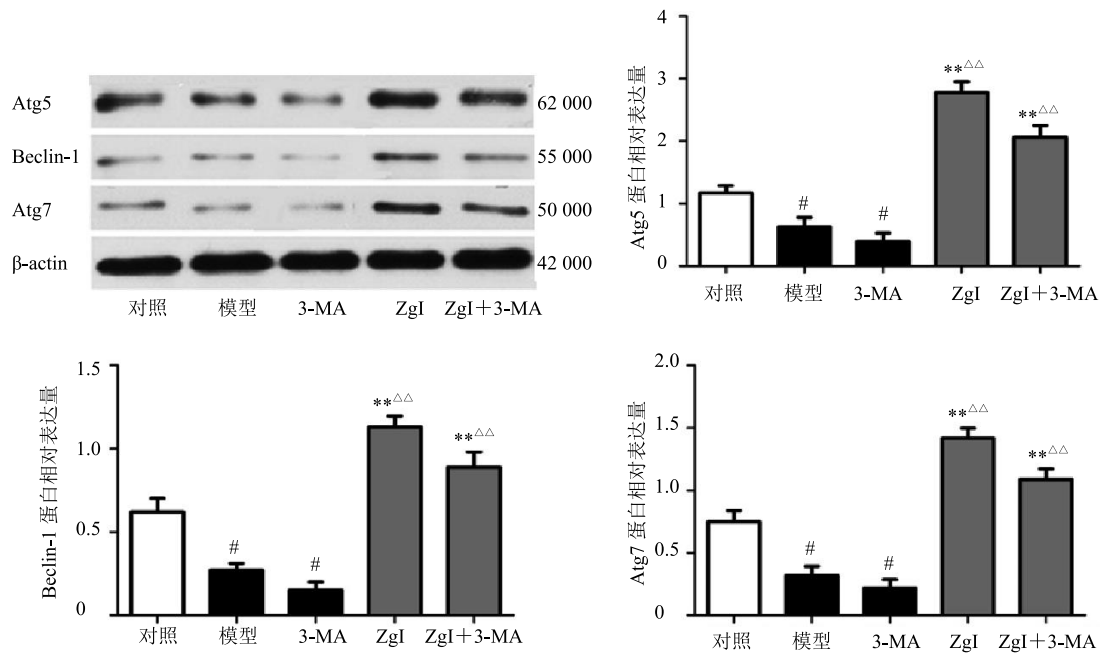


图 6 ZgI 对骨髓抑制小鼠 HSCs Atg5、Atg7 和 Beclin-1 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effect of ZgI on expression of Atg5, Atg7, and Beclin-1 proteins in HSCs of myelosuppression mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

程度进行观察比较,结果表明 ZgI 干预组小鼠 HSCs 自噬活跃程度显著高于模型组和 3-MA 组。

HSCs 作为能进行自我更新的一类细胞,虽然可能长时间处于静默状态,但也必须拥有强大的防御和修复机制来避免细胞损伤,尤其是在放、化疗等严重不良环境中。为了从分子生物学层面进一步确定自噬在 HSCs 自我更新中的作用,国内外学者已采用自噬关键基因敲除的 HSCs 作为研究载体。研究表明,自噬必需基因敲除后, HSCs 在骨髓移植中无法存活,说明 HSCs 的自我更新需要自噬的参与^[23]。在另一项体外实验中, Atg7 敲除的 HSCs 在第 2 次种植时即严重丧失集落形成能力^[24]。使用 3-MA 或者 Atg5 siRNA 抑制自噬后,人类的成熟 HSCs 在集落形成实验中无法形成细胞集落。这些研究结果提示在缺乏自噬的情况下, HSCs 的自我更新能力将会减退。

哺乳动物自噬体和自噬泡的形成依赖于一系列 Atg 蛋白在蛋白泛素化过程中共价结合。其中, Atg5 和 Atg7 被誉为自噬的“核心”,为自噬体形成所必需。在自噬体泛素样结合系统中, Atg12 首先由 E1 样酶 Atg7 活化,之后转运至 E2 样酶 Atg10,最后与 Atg5 结合形成复合物,最后与 LC3 完成泛素化过程^[25]。 Beclin-1 也是自噬关键调控蛋白之一,参与自噬体膜的形成。许多自噬调控蛋白通过与

Beclin-1 的不同结构域或氨基酸发生直接或间接结合,形成蛋白复合体,进而调控自噬水平^[25]。因此 Atg5、Atg7 和 Beclin-1 可以反映自噬不同过程的活化程度。本实验结果表明, ZgI 可显著上调 CTX 和 3-MA 作用后小鼠 HSCs 的 Atg5、Atg7 和 Beclin-1 蛋白表达水平,表明 ZgI 促进 HSCs 自噬与激活自噬关键信号蛋白有关。

综上,本研究首次从自噬对 HSCs 功能的影响探讨 ZgI 升高 WBC 的作用机制。研究结果提示 ZgI 可能通过促进自噬介导了 HSCs 生存机制,从而减少了其凋亡,为其向粒细胞定向分化保障了细胞数量,进而维持了下游 WBC 数量。

参考文献

- [1] Murrow L, Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: Implications for cell injury and human disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8(2): 105-137.
- [2] 郭珊珊, 阎昭. 替莫唑胺治疗脑胶质瘤耐药机制的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(6): 561-565.
- [3] Jacquelin A, Obba S, Solary E, et al. Proper macrophagic differentiation requires both autophagy and caspase activation [J]. *Autophagy*, 2012, 8(12): 1141-1143.
- [4] Gomez-Puerto M C, Folkerts H, Vellenga E, et al. Autophagy proteins ATG5 and ATG7 are essential for the maintenance of human CD34⁺ hematopoietic stem-

- progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(6): 1651-1663.
- [5] Warr M R, Kohli L, Passequé E. Born to survive: Autophagy in hematopoietic stem cell maintenance [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(13): 1979-1980.
- [6] Guan J L, Sion K, Zhang J, *et al.* Autophagy in stem cells [J]. *Autophagy*, 2013, 9(6): 830-849.
- [7] 林巍巍. 自噬在造血系统中的辐射保护作用 [D]. 苏州: 苏州大学, 2014.
- [8] 范奎, 熊永爱, 杨明, 等. HPLC-ELSD法测定地榆总皂苷中地榆皂苷 I 和地榆皂苷 II 的含量 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(6): 2639-2642.
- [9] 代良敏, 熊永爱, 杨明, 等. 三步碱沉法制备地榆总皂苷的工艺优选 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(18): 9-12.
- [10] 杨桂燕, 熊永爱, 杨明, 等. 地榆中化学成分及其促 M-NFS-60 细胞增殖活性的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(6): 2123-2128.
- [11] 代良敏, 熊永爱, 杨明, 等. 地榆皂苷类成分对环磷酸腺苷致小鼠骨髓抑制的保护作用研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(6): 852-859.
- [12] Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, *et al.* DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing [J]. *Nature*, 2007, 447(7145): 686-690.
- [13] Flores I, Canela A, Vera E, *et al.* The longest telomeres: A general signature of adult stem cell compartments [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(5): 654-667.
- [14] Norddahl G L, Pronk C J, Wahlestedt M, *et al.* Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes distinct from physiological stem cell aging [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(5): 499-510.
- [15] Cheng J, Turkel N, Hemati N, *et al.* Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing [J]. *Nature*, 2008, 456(7222): 599-604.
- [16] Celso C L, Scadden D T. The haematopoietic stem cell niche at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(21): 3529-3535.
- [17] Clarke A J, Ellinghaus U, Vyse T J, *et al.* Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development [J]. *An Rheu Dis*, 2014, 74(5): 912-920.
- [18] Xu X, Araki K, Ahmed R, *et al.* Autophagy is essential for effector CD8⁺ T cell survival and memory formation [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(12): 1152-1161.
- [19] Puleston D J, Zhang H, Simon A K, *et al.* Autophagy is a critical regulator of memory CD8⁺ T cell formation [J]. *eLife*, 2014, 3(3): 1-21.
- [20] Sandoval H, Thiagarajan P, Wang J, *et al.* Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells [J]. *Nature*, 2008, 4(54), 232-235.
- [21] Zhang Y, Morgan M J, Liu Z, *et al.* Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation [J]. *Blood*, 2012, 119(12): 2895-2905.
- [22] Rožman S, Yousefi S, Simon H U, *et al.* The generation of neutrophils in the bone marrow is controlled by autophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(3): 445-456.
- [23] Liu F, Lee J Y, Wei H, *et al.* FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells [J]. *Blood*, 2010, 116(9): 4806-4814.
- [24] Mortensen M, Soilleux E J, Djordjevic G, *et al.* The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(12): 455-467.
- [25] 付婉, 董笛, 赵颖, 等. 自噬的相关分子机制 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(5): 448-455.