

徐昊淼,刘朝阳,陈成顺,等. 浙贝黄芩汤调控 *Wip1* 基因表达发挥抗小鼠白血病作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 67-75.

Xu HM, Liu ZY, Chen CS, et al. Therapeutic effect of CFSD in a mouse leukemia model through reducing the expression of *Wip1* [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 67-75.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.12.010

浙贝黄芩汤调控 *Wip1* 基因表达发挥抗小鼠白血病作用

徐昊淼¹,刘朝阳²,陈成顺³,苏鑫³,许亚梅^{3*}

(1.中国人民解放军总医院,北京 100853; 2.国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院,北京 100021; 3.北京中医药大学东直门医院,北京 100700)

【摘要】 目的 明确浙贝黄芩汤体内干预白血病细胞增殖的作用通路,初探浙贝黄芩汤与 *Wip1* 表达水平的相关性。**方法** 尾静脉注射法构建白血病模型小鼠,将其随机为模型组、中药组、化疗组、联合组,另设一组健康小鼠作为空白组。应用浙贝黄芩汤、盐酸多柔比星、及前两者联合对各实验组小鼠进行干预。采用流式细胞技术检测小鼠血液中 CD33⁺CD117⁺ 细胞比例;定时定量 PCR 检测 *Wip1* 的表达水平,Western blot 检测 WIP1 蛋白表达含量。**结果** 联合组的白血病细胞 CD33⁺CD117⁺ 表达最低 ($P < 0.05$);模型组小鼠骨髓中 *Wip1* mRNA 的表达最高,其余各组小鼠骨髓中 *Wip1* mRNA 表达水平有所降低, ($P < 0.05$)。**结论** 浙贝黄芩汤联合化疗能够提高化疗有效率及白血病疾病缓解率,降低 *Wip1* mRNA 表达量;浙贝黄芩汤还能在一定程度上保护小鼠肝脾结构的完整性,抑制白血病细胞增殖。

【关键词】 浙贝黄芩汤;急性髓系白血病;*Wip1*;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 12-0067-09

Therapeutic effect of CFSD in a mouse leukemia model through reducing the expression of *Wip1*

XU Haomiao¹, LIU Zhaoyang², CHEN Chengshun³, SU Xin³, XU Yamei^{3*}

(1. Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. 2. National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021. 3. Dongzhimen Hospital Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700)

【Abstract】 Objective To clarify the role of Compound Fritillaria Scutellaria Decoction (CFSD) as an intervention of leukemia cell proliferation, and to explore the correlation between the administration of CFSD and the expression of *Wip1* in mice. **Methods** Flow cytometry was used to detect the proportion of CD33 positive cells in the mouse blood. The expression level of *Wip1* was detected by real-time quantitative PCR and the expression of WIP1 protein was detected by Western blot. **Results** The positive CD33⁺CD117⁺ leukemia cells of adriamycin plus CFSD (Ad+CFSD) group was the lowest ($P < 0.01$). The expression of *Wip1* mRNA in the bone marrow of model mice was high, and the expression level of *Wip1* mRNA in the bone marrow of the other groups was decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** CFSD

【基金项目】北京市自然科学基金(7152092)。

【作者简介】徐昊淼(1993—),女,研究方向:中西医结合防治恶性血液病。E-mail:457514117@qq.com

【通信作者】许亚梅(1975—),女,博士生导师,研究方向:中西医结合防治恶性血液病。E-mail:xuyamei@sina.com

combined with chemotherapy improved the efficacy of chemotherapy and the remission rate of leukemia, and reduced the expression of *Wip1* mRNA. CFSD protects the integrity of the liver and spleen structures and partly inhibits the proliferation of leukemia cells.

[Keywords] Compound Fritillaria Scutellaria Decoction; CFSD; acute myeloid leukemia; AML; *Wip1*; mouse

白血病的治疗手段主要以化疗、造血干细胞移植及免疫治疗为主。急性白血病特征为复发和对治疗的抵抗,当用标准化学疗法治疗时,60%~80%的患者将达到缓解但是大多数患者会复发,一旦复发,该疾病对重复治疗更具抵抗力^[1]。反复化疗能够引起机体免疫抑制、增加肝肾损伤,使白血病患者生存质量下降甚至导致死亡。以长期临床经验为依据,课题组所在科室研制了以祛瘀化痰为功的复方浙贝颗粒,配合西医临床手段进行治疗。复方浙贝颗粒可与化疗药物联合应用以缓解白血病症状,减轻放化疗毒性,增强化疗药物的敏感性,提高患者免疫功能、抑制细胞恶性增殖,诱导白血病细胞分化凋亡^[2];但该方未能有效缓解白血病患者发热、口舌生疮、厌食等症状,故而在复方浙贝颗粒基础上加一味黄芩,组建了浙贝黄芩汤,既能够改善白血病患者“痰瘀互阻、热毒夹湿”的临床证候,又有助于控制感染,缩短抗生素使用时间,发挥了抗白血病及缓解炎症反应的作用,改善患者生存质量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c nude 小鼠,雌性 27 只,5~6 周龄,小鼠平均体重为(18±0.79)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],饲养于中国科学院动物研究所屏障环境动物房 SPF 层流柜中[SYXK(京)2013-0015]。实验方案符合 3R 原则并通过了北京中医药大学东直门医院实验动物管理和使用委员会(IACUC)审批(2017-39)。

1.1.2 细胞

小鼠白血病细胞 M1 购于上海素尔生物科技有限公司,常规培养并传代。

1.2 主要试剂与仪器

浙贝黄芩汤水煎剂购买于中国北京同仁堂(集团)有限公司,组成:浙贝母、黄芩、川芎、防己,并由北京同仁堂制备熬成中药汤剂,每剂熬成中药汤剂浓煎 50 mL,分装于 15 mL 离心管中,于 4℃ 冰箱中保存。

注射用盐酸多柔比星(海正辉瑞制药有限公

司,H33021980):用 5 mL 无菌水溶解药末,配制成 1 mg/mL 的储备液,避光保存于-20℃ 冰箱备用,实验临用时,用灭菌注射用水稀释该储备液至 0.1 mg/mL。

RPMI-1640 培养基(北京利维宁生物科技有限公司);Gibco 胎牛血清(北京裕恒丰科技有限公司);青霉素和链霉素各 100 U/mL(Sigma);Anti-Mouse CD117-APC、Anti-Mouse CD33-PE-Cyanine7 (ThermoFisher)。Wip1(D47) Rabbit mAb #11901 一抗(Cell Signaling)PBS;TRIzol(美国 Sigma 公司);50 mL 离心管、15 mL 离心管(美国 Corning 公司);氯仿、无水乙醇(北京化工厂);PCR 耗材(北京希凯恩生物科技有限公司);DEPC 水(GenStar 公司);AMV Buffer、5×AMV Buffer、dNTP、RNA inhibitor、SYBR Premix Ex Taq(大连宝生物 Takara 公司);β-actin、Wip1、P53 实时定量 PCR 引物(北京擎科新业生物技术有限公司);Oligo DT(北京鼎国昌盛生物技术有限公司)。

台式冷冻离心机(美国 ThermoScientific,型号 Sorvall Legend RT);CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司,型号 EpicsXL);反转录仪(美国伯乐,C1000);荧光定量 PCR 仪(ABI7500 美国伯乐);蛋白质常规电泳系统电泳仪、凝胶成像系统、垂直电泳槽(美国伯乐 Mini-PROTEAN Tetra)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞及动物

白血病细胞 M1 接种于含有 20% 胎牛血清的 1640 培养基的 10 cm 细胞培养皿中,37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下的培养箱中培养。

小鼠饲养于中国科学院动物研究所屏障环境动物房 SPF 层流柜中,含复合维生素 B 的标准颗粒饲料、饮水、垫料及一切与鼠接触的物品均经灭菌处理。实验室内温度约为 25℃,相对湿度为 40%~70%,每日光照时间为 12 h,实验前适应性饲养 1 周。

1.3.2 造模及分组

将对数生长期的小鼠白血病细胞 M1 浓度调整为 8×10⁶ 个/只,通过尾静脉注射法构建小鼠白血病

模型^[3]。依据总体设计对该实验进行分组,造模成功后,将白血病模型动物随机分成四组,每组 6 只,共 24 只即:模型组、浙贝黄芩汤灌胃(中药)组、盐酸多柔比星腹腔注射(化疗)组、浙贝黄芩汤灌胃+盐酸多柔比星腹腔注射(联合)组,另将 3 只健康小鼠设为空白对照组。

1.3.3 实验动物给药方案

经尾静脉注射细胞 10 d 后检测动物外周血白细胞计数,CD33⁺CD117⁺细胞比例以鉴定模型,造模成功后开始给药。模型组动物灌胃等剂量蒸馏水;中药组灌胃浙贝黄芩汤,化疗组腹腔注射多柔比星,联合组灌胃浙贝黄芩汤、腹腔注射多柔比星。

多柔比星药剂量为 1 mg/kg,隔日 1 次,共 7 次,为使化疗药效充分发挥,停药后适应性饲养一周观察;浙贝黄芩汤的用药剂量为临床用药的 7 倍(7.58 g/kg),每日 1 次,共 21 次。

1.3.4 实验观察指标

观察小鼠的一般情况,检测血常规。

于给药后第 30 天或动物濒死前处死取材,眼球取血收集动物血液检测 *Wip1* mRNA,观察动物肝脾的形态,取胫骨、腓骨骨髓 FCM 检测骨髓中 CD33⁺CD117⁺比例;取部分肝脾进行 Western blot 检测 WIP1 的蛋白表达,余下部分进行组织病理切片 HE 染色,观察浸润灶。

实时定量 PCR 检测引物序列见表 1。



图 1 模型组、中药组、化疗组、联合组的生存状态

Figure 1 The survival status of the mice in the Model group, CFSD group, Adr group and Adr+CFSD group

饮食、精神、活动方面有所改善,以联合组效果最好,中药组与联合组小鼠生存期较模型组延长,但中药组和联合组小鼠出现腹泻,严重者可见脱肛,脱出肛门可自行收回。实验第 10 天时小鼠开始出现死亡,至第 14 天时,模型组小鼠数量减半,与模型组比较,中药组及联合组小鼠中位生存期明显延长。至实验结束时,空白组小鼠未出现死亡,生存率 100%。见图 2。

2.2 小鼠给药干预后体重变化

第 20 天时,模型组、中药组、化疗组小鼠体重下

表 1 实时定量 PCR 检测引物序列
Table 1 Real-time quantitative PCR detection of primer sequences

基因名称 Name of gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
<i>Wip1</i> 上游 Upstream of <i>Wip1</i>	5'-AAGAACTGGCGGAATGGC-3'
<i>Wip1</i> 下游 Downstream of <i>Wip1</i>	5'-CCAAGAACCACCCCTGAGTC-3'
β -action 上游 Upstream of β -action	5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCT-3'
β -action 下游 Downstream of β -action	5'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT-3'

1.4 统计学分析

本实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,通过 SPSS 20.0 统计软件进行分析,各组数据进行比较,符合正态分布方差齐的用单因素方差检验,组间比较采用 LSD 法进行分析;方差不齐时采用非参数检验,组间比较采用 Tamhane's (M)法进行分析, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 时认为差异极有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

经尾静脉接种白血病细胞后,随时间延长,实验组小鼠出现食欲不佳,精神萎靡,喜静恶动,皮肤粗糙、皱褶增多等现象,见图 1。与模型组小鼠相比,经药物干预的中药组、化疗组及联合组小鼠在

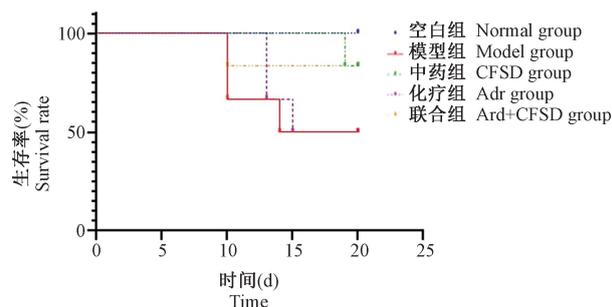


图 2 各组小鼠生存曲线

Figure 2 Survival curves of the mice in each group

降与空白组相比具有明显差异;第 20 天时,除空白组外,各组小鼠体重均有下降,模型组体重最低,联合组体重下降趋势最平缓。联合组与空白组比

较差异无统计学意义,治疗组与模型组比较均无统计学差异。见表 2、图 3。

表 2 各组小鼠体重变化(g, $\bar{x}\pm s$)
Table 2 Changes in body weight of the mice in each group

组别 Group	<i>n</i>	干预前 Before	第 1 天 1 st day	第 5 天 5 th day	第 10 天 10 th day	第 15 天 15 th day	第 20 天 20 th day
空白组 Normal	3	18.32±0.24	18.72±0.37	19.69±0.33	19.85±0.02	19.97±0.49	19.79±0.38
模型组 Model	6	17.83±1.30	18.63±0.65	18.68±0.60	18.51±1.03	17.33±1.07	14.50±1.17**
中药组 CFSD	6	17.94±0.70	18.20±0.68	18.76±0.68	18.27±0.83	17.65±1.61	15.66±2.35**
化疗组 Adr	6	18.19±0.54	18.24±0.98	19.20±0.99	18.18±0.89	16.72±1.84	15.11±3.65**
联合组 Adr+CFSD	6	17.88±0.76	18.02±1.36	18.46±1.43	17.53±2.14	17.78±1.48	17.08±1.84
<i>F</i>		0.758	3.492	1.066	6.361	6.927	3.268
<i>P</i>		0.564	0.686	0.399	0.140	0.089	0.039

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

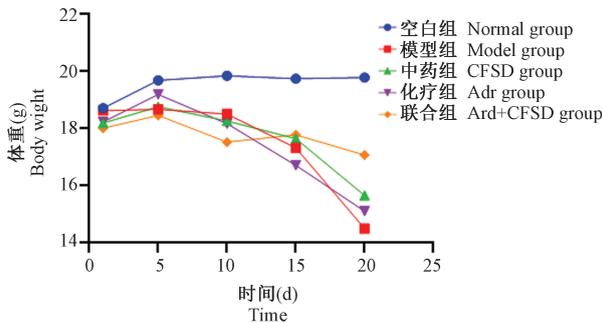


图 3 各组小鼠体重变化曲线

Figure 3 Body weight curves of the mice in each group

2.3 小鼠干预前后全血细胞分析变化情况

与空白组相比,各组小鼠外周血白细胞明显升高,与模型组相比,治疗组小鼠外周血白细胞数量下降;与空白组相比,各组小鼠外周血血红蛋白稍有降低,化疗组外周血血红蛋白含量明显低于其他组;各组小鼠外周血血小板计数虽有变化,与模型组相比差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.4 外周血涂片白血细胞比例

除空白组外,各组小鼠外周血涂片中可见白血病细胞,与模型组比较,化疗组及联合组小鼠外周血白血病细胞比例显著降低,中药组与模型组、化疗组与联合组比较时差异无统计学意义,见表 4。

表 3 小鼠全血细胞分析($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Changes in whole blood cell analysis of the mice

组别 Groups	<i>n</i>	白细胞计数($\times 10^9/L$) WBC counts($\times 10^9/L$)	血红蛋白含量(g/L) Hemoglobin content(g/L)	血小板计数($\times 10^9/L$) Platelet count($\times 10^9/L$)
空白组 Normal	3	2.81±0.31	158.67±9.29	760.67±64.83
模型组 Model	6	9.33±2.20*	156.67±10.01	833.33±135.71
中药组 CFSD	6	6.55±2.26*#	155.01±21.80	689.50±152.31
化疗组 Adr	6	4.09±2.70**##	121.67±23.05##	874.33±399.36
联合组 Adr+CFSD	6	6.67±2.04	141.20±8.04	1054.60±260.065
<i>F</i>		5.897	4.673	1.602
<i>P</i>		0.003	0.007	0.211

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group,* $P<0.05$,** $P<0.01$. Compared with the model group,# $P<0.05$,## $P<0.01$.

表 4 小鼠外周白血血病细胞比例($\bar{x}\pm s, n=6, \%$)

Table 4 Changes in the proportion of leukemia cells in peripheral blood of the mice

组别 Groups	白血血病细胞 Leukemia cells
模型组 Model	12.60±9.71
中药组 CFSD	7.00±3.61
化疗组 Adr	1.58±1.75 ^{##}
联合组 Adr+CFSD	2.75±1.67 [#]
<i>F</i>	8.574
<i>P</i>	0.036

注:与模型组比较, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01。

Note. Compared with the model group, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01.

2.5 CD33⁺CD117⁺细胞比例

与空白组相比,各组小鼠骨髓中 CD33⁺CD117⁺表达量显著增高;与模型组相比,治疗组小鼠骨髓中 CD33⁺CD117⁺表达量下降,模型组>中药组>化疗组>联合组,中药组与化疗组、中药组与联合组、化疗组与联合组比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。

与模型中相比,各组小鼠外周血细胞中 CD33⁺CD117⁺比例下降,模型组>中药组>化疗组>联合组,中药组与化疗组、中药组与联合组比较,差异无统计学意义,见表 5、图 4。

2.6 小鼠脾称重

与空白组相比,各组小鼠都有不同程度的脾大,中药组小鼠脾重量最轻,联合组次于中药组,与化疗组脾重量相当,模型组>化疗组>联合组>中药组,中药组与化疗组、中药组与联合组比较差异有统计学意义(*P*<0.01),见表 6、图 5。

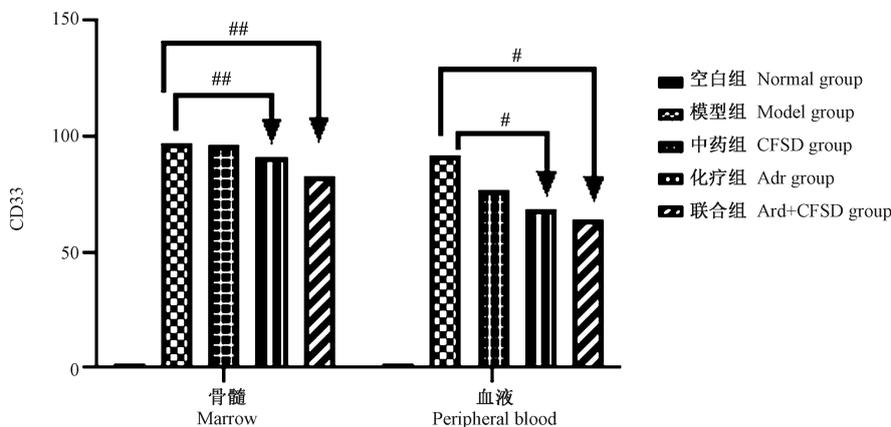
表 5 小鼠骨髓及外周血中 CD33⁺CD117⁺表达($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 5 Changes of CD33⁺CD117⁺ expression in bone marrow and peripheral blood of the mice

组别 Groups	<i>n</i>	骨髓 Bone marrow	外周血 Peripheral blood
空白组 Normal	3	0.75±0.29	-
模型组 Model	6	47.75±11.76	18.89±2.52
中药组 CFSD	6	40.14±11.62 ^{##}	10.52±2.28 ^{##}
化疗组 Adr	6	26.43±4.09 ^{##}	3.85±0.24 ^{##}
联合组 Adr+CFSD	6	15.36±5.58 ^{##}	2.13±0.61 ^{##}
<i>F</i>		23.495	48.616
<i>P</i>		0.000	0.000

注:与空白组比较, **P*<0.05, ***P*<0.01;与模型组比较, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01。

Note. Compared with the normal group, **P*<0.05, ***P*<0.01. Compared with the model group, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01.



注: [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01。

图 4 小鼠骨髓及血液中 CD33 阳性细胞

Note. [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01.

Figure 4 CD33 positive cells in the blood of mice

小鼠肝称重可见各组重量相当, 各组比较无统计学差异。

2.7 小鼠肝脾形态变化

各组小鼠脾都有不同程度的肿大, 除中药组外, 其余各组脾均可见坏死灶; 镜下视野可见小鼠脾中存在多核仁、瘤聚细胞形成的浸润灶组织, 体积大, 核大而圆, 脾结构被白血病细胞破坏。模型组小鼠的脾中有大量弥漫性白血病细胞浸润灶, 数量上明显多于其他三组, 一个 400 倍视野最多可观察到 5~6 个白血病细胞。中药组及联合组小鼠脾病理切片中, 能够观测到的白血病细胞浸润灶较少, 脾内结构基本完整, 但依然可见有白血病细胞

的浸润。

镜下可见各组小鼠的肝组织结构被破坏, 部分白血病细胞浸润, 各组小鼠肝表面可见白色浸润灶, 模型组小鼠浸润灶数量较多, 单纯中药组及联合组小鼠肝较少, 化疗药小鼠肝表面粗糙, 考虑可能是由于化疗药物所致, 联合组小鼠未见严重的肝损伤, 考虑可能与中药的作用有关。见图 6、图 7。

2.8 小鼠 *Wip1* mRNA 的表达水平

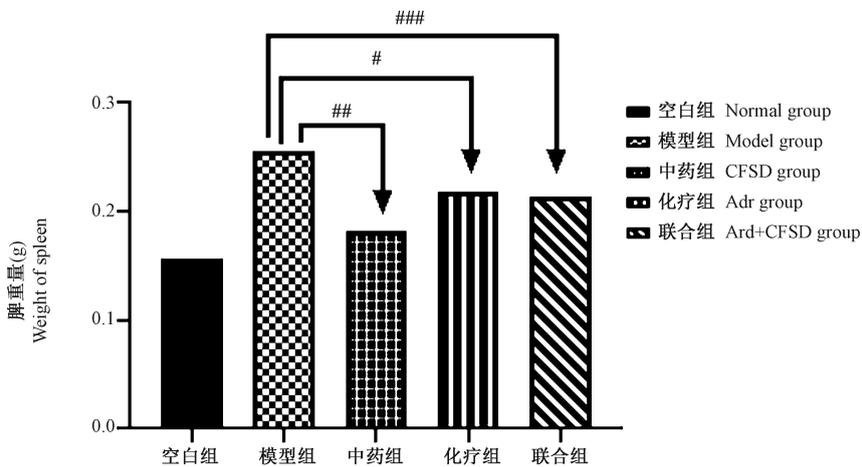
模型组较空白组骨髓 *Wip1* mRNA 显著增加, 治疗组 *Wip1* mRNA 表达量较模型组显著降低, 联合组的小鼠骨髓 *Wip1* mRNA 的表达最低, 模型组 > 化疗组 > 中药组 > 联合组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 6 小鼠肝脾的重量 ($\bar{x} \pm s, g$)
Table 6 Weight of liver and spleen of the mice

组别 Groups	<i>n</i>	肝 Liver	脾 Spleen
空白组 Normal	3	1.066190 ± 0.034459	0.156837 ± 0.009639
模型组 Model	6	1.167540 ± 0.153007	0.255680 ± 0.030474 **
中药组 CFSD	6	0.992438 ± 0.041468	0.182473 ± 0.007355 ##
化疗组 Adr	6	1.059987 ± 0.403035	0.218290 ± 0.013861 * #
联合组 Adr+CFSD	6	1.096196 ± 0.192931	0.213370 ± 0.008098 * ##
<i>F</i>		0.553	15.035
<i>P</i>		0.700	0.002

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.



注: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 5 各组小鼠脾称重

Note. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Comparison of the mouse spleen weight in each group

各组外周血中 *Wip1* mRNA 表达差异较小无统计学意义,见表 7、图 8。

2.9 Western blot 结果

反复实验加大检测蛋白剂量后,各组肝脾中

WIP1 蛋白表达量仍无明显变化,中药组、化疗组、联合组与模型组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$), WIP1 在白血病小鼠肝脾中的表达仍需进一步研究,见表 8、图 8。

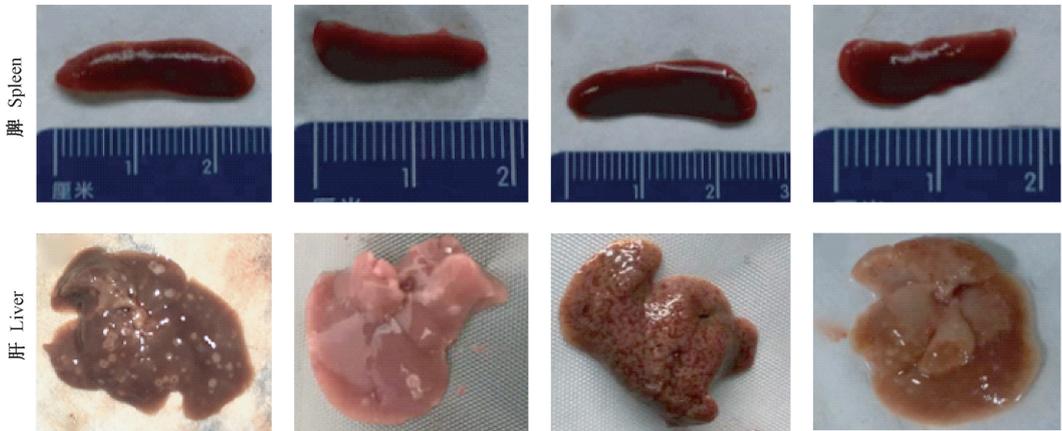


图 6 各组小鼠肝脾形态图

Figure 6 Gross appearance of the mouse spleen and liver in each group

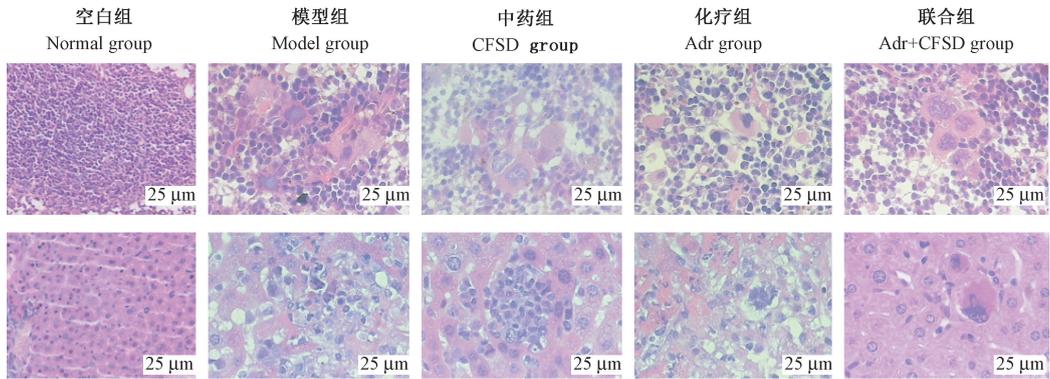


图 7 各组小鼠脾的病理变化(HE 染色)

Figure 7 Pathological changes of the mouse spleen in each group(HE staining)

表 7 各组小鼠骨髓及血液中 *Wip1* mRNA 的相对表达量

Table 7 Relative expression levels of *Wip1* mRNA in bone marrow and blood of the mice in each group

组别 Groups	<i>n</i>	骨髓 <i>Wip1</i> mRNA ($2^{-\Delta\Delta ct}$) Bone marrow <i>Wip1</i> mRNA ($2^{-\Delta\Delta ct}$)	外周血 <i>Wip1</i> mRNA ($2^{-\Delta\Delta ct}$) Peripheral blood <i>Wip1</i> mRNA ($2^{-\Delta\Delta ct}$)
空白组 Normal	3	0.007271±0.006893	0.017600±0.00665
模型组 Model	6	0.511956±0.279827**	0.023320±0.01722
中药组 CFSD	6	0.064957±0.078797##	0.030802±0.037399
化疗组 Adr	6	0.086938±0.122472##	0.036285±0.045027
联合组 Adr+CFSD	6	0.004180±0.005286##	0.062867±0.044751
<i>F</i>		7.249	0.509
<i>P</i>		0.005	0.621

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the model group, ## $P<0.05$, ### $P<0.01$.

表 8 肝脾中 WIP1 蛋白表达量
Table 8 WIP1 protein expression in the mouse spleens and livers

组别 Groups	<i>n</i>	肝 Liver	脾 Spleen
模型组 Model	6	1.79109±0.791215	0.843202±0.440376
中药组 CFSD	6	1.391820±0.104193	0.570722±0.134508
化疗组 Adr	6	2.007638±1.245649	0.686813±0.473918
联合组 Adr+ CFSD	6	0.699283±0.574589	1.316585±0.672198
<i>F</i>		1.020	2.385
<i>P</i>		0.433	0.497

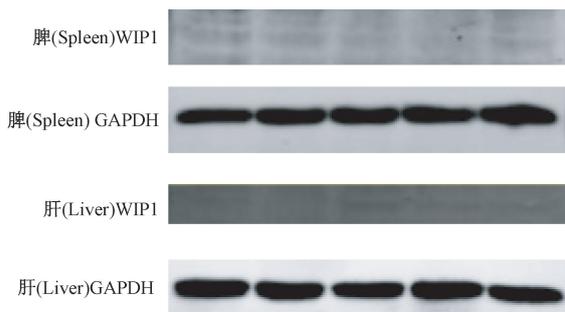


图 8 小鼠肝脾中 WIP1 蛋白量表达

Figure 8 Expression of WIP1 protein in the mouse livers and spleens

3 讨论

Wip1 由野生型 P53 诱导^[4-5], 属于 2C 型丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 PP2C 家族中的一员, 是 DNA 损伤反应和肿瘤发生的重要调节因子, 能够参与造血功能调节。*Wip1* 由催化结构域 N 端和非结构化 C 端组成^[6], 与 PP2C 家族的其他成员不同的是, 其靠近活性位点的催化结构域中存在独特的皮瓣亚结构域, 使得 *Wip1* 能够选择性作用于其它磷酸酶^[7-8]。*Wip1* 既能够直接作用于 P53 的去磷酸化过程, 使 Ser15 位点失活, 也能够作用于 p38 蛋白 (Thr180) 蛋白激酶来抑制 P38 通路下游的分子 P53 的活性^[9-11]。*Wip1* 基因的缺失或者失活能够抑制肿瘤的发生发展, 多种实体瘤的发病都与 *Wip1* 的过表达有关^[12-13], 在血液肿瘤中也存在 *Wip1* 的过表达^[14-15]。

中药能够缓解癌症症状, 减轻放化疗毒性, 提高患者生存质量, 延长生存期, 在多种恶性病的治疗中均有应用^[16-22]。本次实验应用急性髓系白血病动物模型, 探索浙贝黄芩汤能否通过下调 *Wip1* 的表达发挥抗白血病作用。方中浙贝味苦性寒, 归

肺、心经, 功效化痰止咳, 清热散结; 黄芩, 其味苦、性寒, 归肺、心、肝、胆、大肠经, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血等功效; 防己味苦、辛, 性寒; 归膀胱、肺经, 可祛风胜湿; 川芎, 辛, 温, 归肝、胆、心包经, 可活血行气, 祛风止痛。四药相和发挥抗白血病作用, 既能与白血病细胞抗衡, 又有效的保护小鼠脏器的完整性; 浙贝黄芩汤与化疗药各有优势又相辅相成, 能够有效减轻化疗的副作用, 一定程度上能够提高小鼠生存质量, 且中药、化疗药均能够通过 *Wip1* 通路发挥作用, 下调 *Wip1* mRNA 的相对表达量。由于白血病发展后期实验组小鼠状况较差无法收集足够的骨髓样本分选细胞进行 Western blot 实验, 故实验改用肝脾组织进行检测, 小鼠的肝脾组织中虽有大量白血病细胞浸润, 但多次实验仍未检测出 WIP1 蛋白条带, 分析可能是由于 *Wip1* 从基因到蛋白层面间存在复杂的转录翻译过程^[23-24], 使基因表达与蛋白表达之间存在差异, 因此我们仍需进一步研究, 为日后明确中药复方浙贝黄芩汤如何发挥作用提供研究基础。

本实验证实了浙贝黄芩汤能够降低 *Wip1* 在白血病基因中的表达, 一定程度上能够缓解白血病症状、保护脏器完整性、提高化疗有效率, 但单纯应用浙贝黄芩汤对抗白血病效力较弱, 需与化疗药结合才能更好的发挥抗白血病的作用。

参考文献:

- [1] Lais PG, Rebecca G, Anderson, et al. The role of AMPK in chemotherapy response in AML [J]. Blood, 2018, 132: 2633.
- [2] 李冬云, 田劭丹, 叶霏智, 等. 复方浙贝颗粒辅助化疗提高难治性急性白血病临床疗效研究 [J]. 北京中医, 2007, 26 (2): 72-74.
- [3] 徐昊森, 李雅竹, 程涓, 等. 尾静脉注射 M1 细胞构建 BALB/c 裸鼠髓系白血病模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29

- (6): 45-50
- [4] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 复发难治性急性髓系白血病中国诊疗指南(2017 年版) [J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(3): 183-184.
- [5] Fiscella M, Zhang H, Fan S, et al. *Wip1*, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a P53-dependent manner [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(12): 6048-6053.
- [6] 吕俊廷, 杨志刚, 管有洪, 等. 急性髓系白血病治疗前后白血病干细胞的变化 [J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(3): 658-664.
- [7] 杜云云. 老年急性髓系白血病治疗效果及预后因素分析 [J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(12): 21-22.
- [8] 杨柳, 丁小凤, 胡翔, 等. *Hoxa* 家族基因在白血病中的表达及意义 [J]. 湖南理工学院学报(自然科学版), 2018, 31(1): 47-51+86.
- [9] 杨红, 刘建兴, 周泽平, 等. 应用 SCID 和 NOD/SCID 小鼠构建急性髓系白血病模型成瘤率的比较 [J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(2): 328-334.
- [10] 周小东, 雷行华. 原癌基因与造血系统恶性肿瘤的研究 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33(14): 2407-2411.
- [11] Agarwal S, Kazi JU, Rönnstrand L. Phosphorylation of the activation loop tyrosine 823 in c-Kit is crucial for cell survival and proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(31): 22460-22468.
- [12] 陆伟, 丁润生, 姜胜华. CD117 在白血病细胞中的表达及意义 [J]. 中国交通医学杂志, 2004, 18(3): 243-244.
- [13] 郑文娟, 李建勇, 吴雨洁, 等. CD117 在急性髓细胞白血病中的表达特异度 [J]. 临床血液学杂志, 2007, 20(1): 5-7.
- [14] 张坤, 徐昊森, 程涓, 等. 尾静脉注射 HL60、HL60/ADR 细胞建立 SCID beige 小鼠白血病动物模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 43-51.
- [15] 徐玉洁, 贾文华, 刘苍春, 等. 人源化慢性髓系白血病小鼠模型的建立 [J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(5): 1329-1333.
- [16] 付春玲, 龚艳青, 万艳, 等. 应用 MEC-1 与 HG3 细胞株建立慢性淋巴细胞白血病 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤的模型 [J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(6): 1644-1648.
- [17] 王礼学. K562/BALB/c 裸鼠白血病模型的建立及 LDR、IM7 对 CML 患者骨髓干/祖细胞集落形成能力影响的研究 [D]. 徐州: 徐州医学院, 2008.
- [18] 时彦胜, 耿志贤, 战大伟, 等. SCID 小鼠和 BALB/c 裸鼠对两株人体肿瘤细胞系移植敏感性的研究 [J]. 中国实验动物学杂志, 2000, 10(1): 8-13.
- [19] Zunino SJ, Storms DH, Newman JW, et al. Resveratrol given intraperitoneally does not inhibit the growth of high-risk t(4;11) acute lymphoblastic leukemia cells in a NOD/SCID mouse model [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(4): 1277-1284.
- [20] Greenblatt S, Li L, Slape C, et al. Knock-in of a FLT3/ITD mutation cooperates with a NUP98-HOXD13 fusion to generate acute myeloid leukemia in a mouse model [J]. *Blood*, 2012, 119(12): 2883-2894.
- [21] 单武林, 章成芳, 马筱玲, 等. 不同方法接种构建的 SCID 小鼠 HL-60 白血病模型生物学特性分析 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(6): 837-841.
- [22] 温顺祝, 傅红春, 李晓明, 等. 290 例成人急性髓系白血病临床特点及治疗效果 [J]. 西南国防医药, 2018, 28(1): 47-50.
- [23] 范金清. 急性白血病患者凝血与纤溶指标的特点分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(4): 125-126.
- [24] 田晓琳, 许亚梅, 王珍珍, 等. 尾静脉注射及皮下接种方法建立小鼠高表达 miR-17-92 的 L1210 白血病模型的比较研究 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(8): 3449-3453.

[收稿日期] 2019-03-14