

益气养阴方及其拆方影响急性髓细胞白血病细胞 Flt3 和 N-ras 表达研究

徐瑞荣¹ 刘奎¹ 王晓玲¹ 胡述博¹ 崔兴¹ 王琰¹ 王敬毅¹ 李丽珍²

摘要 目的 研究益气养阴方及其拆方后的扶正方、祛邪方对 Flt3 和 N-ras 在人急性髓细胞白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 表达的影响, 探讨益气养阴方治疗白血病的作用机制。**方法** 收集 60 例 AML 患者骨髓单个核细胞, 将所提取每例患者的细胞混悬液分成 4 组: 对照组不加药物, 实验组分别加入益气养阴方、扶正方、祛邪方中药制剂。采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR), 免疫印迹法 (Western blotting) 观察益气养阴组、扶正组、祛邪组及对照组对 Flt3、N-ras 基因及 FLT3 蛋白表达的影响。**结果** RT-PCR 法检测: 对照组、益气养阴组、扶正组、祛邪组 Flt3 基因表达率分别为 $(90.78 \pm 6.92)\%$ 、 $(38.18 \pm 4.50)\%$ 、 $(65.57 \pm 5.55)\%$ 、 $(61.35 \pm 6.39)\%$, N-ras 基因表达率分别为 $(93.28 \pm 5.54)\%$ 、 $(34.38 \pm 6.69)\%$ 、 $(59.42 \pm 7.35)\%$ 、 $(65.28 \pm 7.64)\%$, 益气养阴组、扶正组、祛邪组与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blotting 检测: 对照组、益气养阴组、扶正组、祛邪组 FLT3 蛋白灰度值分别为 0.8127 ± 0.0284 、 0.4265 ± 0.0353 、 0.5396 ± 0.0274 、 0.5473 ± 0.0282 , 对照组与益气养阴组、扶正组、祛邪组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 中药益气养阴方可抑制 AML 细胞的克隆性增殖, 可降低 Flt3 和 N-ras 在 AML 细胞的表达水平, 对 AML 治疗具有作用。

关键词 益气养阴方; 急性髓细胞白血病; Flt3; N-ras

Study on the Effect of Yiqi Yangyin Recipe and Its Different Assembling on Expressions of Flt3 and N-ras in Acute Myeloid Leukemic Cells XU Rui-rong, LIU Kui, WANG Xiao-ling, et al Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250011)

ABSTRACT Objective To study the action mechanism of Yiqi Yangyin Recipe (YYR) in treating leukemia by observing the effects of YYR and its different assembling, energy supporting part (P1) and evil dispelling part (P2) on expressions of Flt3 and N-ras gene in acute myeloid leukemic (AML) cells. **Methods** The mononuclear cells collected from bone marrow of 60 AML patients were assigned to four groups: the blank was untreated for control and the three tested groups were treated with YYR, P1 and P2, respectively. The effects on Flt3 and N-ras gene expressions and FLT3 protein expression were observed by RT-PCR and Western blotting. **Results** RT-PCR test showed the expression of Flt3 in the control, YYR, P1 and P2, group was $90.78\% \pm 6.92\%$, $38.18\% \pm 4.50\%$, $65.57\% \pm 5.55\%$ and $61.35\% \pm 6.39\%$, respectively; and that of N-ras in them $93.28\% \pm 5.54\%$, $34.38\% \pm 6.69\%$, $59.42\% \pm 7.35\%$ and $65.28\% \pm 7.64\%$, respectively, both showed significant difference as compared the data in the tested groups with those in the control group ($P < 0.05$). Western blotting test showed the FLT3 protein gray value in the four groups was 0.8127 ± 0.0284 , 0.4265 ± 0.0353 , 0.5396 ± 0.0274 and 0.5473 ± 0.0282 , respectively, also showed significant difference between the control and the tested groups ($P < 0.01$). **Conclusion** YYR can inhibit the clonic proliferation of AML cells, decrease the expressions of FLT3 and N-ras in cells, therefore shows a therapeutic effect on AML.

KEYWORDS Yiqi Yangyin Recipe; acute myeloid leukemia; Flt3, N-ras

基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 30672746); 山东省科技厅攻关项目 (No. 2006GG3202048)

作者单位: 1. 山东中医药大学附属医院血液科 (济南 250011); 2. 山东大学齐鲁医院免疫室

通讯作者: 徐瑞荣, Tel: 0531-68617964, E-mail: xrr18@sina.com

Flt3 基因是近年发现的早期造血生长因子受体基因, 它与 c-kit、c-fms 同属于 III 型酪氨酸激酶家族。在 70% ~ 90% 患者白血病细胞上有 Flt3 过量表达, 而在白血病以外的肿瘤细胞中至今未有 Flt3 表达的报道, Flt3 被认为是白血病特异性的靶分子^[1-3]。ras 癌基

因(rat sarcoma)是一个普遍存在的真核基因家族,可分为 N-ras、K-ras 和 H-ras,在造血系统恶性疾病中 N-ras 癌基因是 ras 癌基因突变体最高的一种,AML 中有 20% ~ 30% 可出现 N-ras 癌基因点突变。我们观察了益气养阴方及其拆方后的扶正方、祛邪方对 Flt3 和 N-ras 在人急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)表达的影响,探讨益气养阴方治疗白血病的作用机制,现报告于下。

资料与方法

1 临床资料 2006 - 2007 年山东中医药大学附属医院、山东大学齐鲁医院血液科就诊的 AML 初治患者 60 例,男 35 例,女 25 例;年龄 6 ~ 56 岁,中位年龄 31 岁;病程 1 ~ 3 个月,中位月数 2.5 个月。60 例患者经骨髓细胞形态学、组织化学和流式细胞术免疫分型确诊为 AML。FAB 分型 M1 5 例,M2 15 例,M4 9 例,M5 20 例,M6 8 例,M7 3 例。60 例患者取骨髓标本,提出骨髓单个核细胞,每个标本分为 4 份,分别用作对照组、益气养阴组、扶正组、祛邪组的研究对象。

2 中药组成及制剂 (1)益气养阴方:黄芪 30 g 白花蛇舌草 30 g 小蓟 30 g 太子参 30 g 半枝莲 30 g 蒲公英 30 g 生地 18 g 黄精 21 g 女贞子 21 g 旱莲草 18 g 天冬 15 g 麦冬 15 g 白术 12 g 茯苓 12 g 甘草 5 g。(2)扶正方:黄芪 30 g 太子参 30 g 生地 18 g 黄精 21 g 女贞子 21 g 天冬 15 g 麦冬 15 g 白术 12 g 茯苓 12 g 甘草 5 g。(3)祛邪方:白花蛇舌草 30 g 小蓟 30 g 半枝莲 30 g 蒲公英 30 g 旱莲草 18 g。上述 3 种药方由我院中药制剂实验室配制成 1 g/mL 的药液,罐装于 250 mL 输液瓶中,流通蒸汽于 105 ℃ 灭菌,无菌试验阴性后用 RPMI 1640 液(含青、链霉素各 100 u/mL),正压过滤除菌,备用。

3 仪器 PCR 扩增仪(HYBAID, UK);电泳仪(DYY-Ⅲ2);高速离心机(美国 BECKMAN 公司);BB16 气体培养箱、HF-safe-1200 型生物安全柜;凝胶成像仪。

4 试剂 无酚红 RPMI1640 培养液(美国 GBICO 公司);Trizol(美国 Invitrogen);引物合成(上海生工生物工程有限公司);PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒(DRR014A TaKaRa);兔抗人多克隆 Flt3 一抗(美国 MillPore 公司);HRP 标记的山羊抗鼠二抗(北京中杉生物公司);ECL 发光试剂盒(美国 MillPore 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海申能博彩生物

科技公司)。Flt3、N-ras、β-actin 基因引物(表 1)。

表 1 Flt3、N-ras 及 β-actin 基因引物

基因	引物	产物长度(bp)
Flt3	L:5'-TCAAGTGCTGTGCATACAATTCCC-3'	186
	R:5'-CACCTGTACCATCTGTAGCTGGCT-3'	
N-ras	L:5'-AATCCAGCTAATCCAGAACCC-3'	131
	R:5'-TGGTCTCTCATGGCACTGTA-3'α-actin	
β-actin	L:5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3'	285
	R:5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'	

5 骨髓单个核细胞的提取 (1)常规无菌采集 60 例患者骨髓 5 mL,肝素抗凝。(2)用 10 mL 离心管,先注入 5 mL 淋巴细胞分离液,再将骨髓液缓缓注入,使其浮于分离液上层。(3)水平离心 1 800 r/min, 20 min。(4)将离心管垂直缓慢移入超净工作台,用毛细吸管仔细吸取中间白色悬浮层,PBS 液洗 2 次,细胞计数。

6 细胞培养 骨髓单个核细胞提取后,置 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱中培养到对数生长期,细胞换液。将所提取每例患者的细胞混悬液分成 4 组:对照组不加药物,实验组分别加入益气养阴方、扶正方、祛邪方中药制剂,终浓度为 100 μg/mL。继续培养 48 h 用于实验。

7 Flt3 和 N-ras 基因表达 采用逆转录 - 聚合酶链反应(RT-PCR)检测。

8 FLT3 蛋白表达 免疫印迹法(Western blotting)检测。

9 统计学方法 全部数据用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析,采用单因素方差分析。

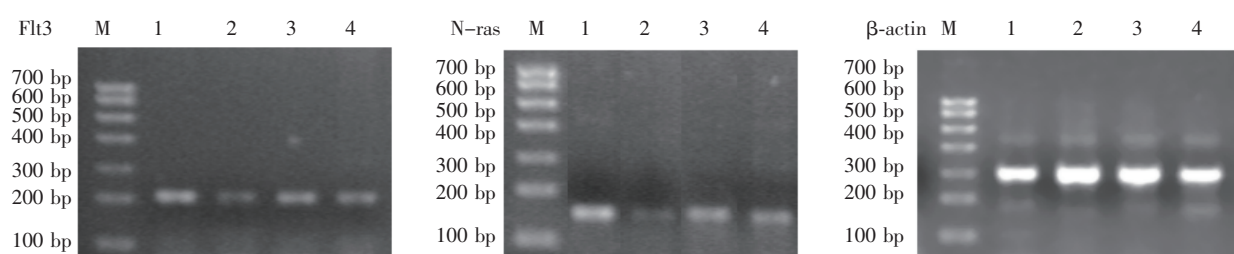
结 果

1 各组 Flt3 和 N-ras 基因表达率比较 与对照组比较,益气养阴组、扶正组、祛邪组 Flt3 和 N-ras 基因表达阳性率降低(表 2),差异均有统计学意义(P < 0.05)。对照组 Flt3、N-ras 基因检测阳性患者经 PCR 扩增后分别在 186 bp、131 bp 位置可发现特异性条带(图 1)。

表 2 各组间 Flt3 和 N-ras 基因表达率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Flt3	N-ras
对照	60	90.78 ± 6.92	93.28 ± 5.54
益气养阴	60	38.18 ± 4.50*	34.38 ± 6.69*
扶正	60	65.57 ± 5.55*	59.42 ± 7.35*
祛邪	60	61.35 ± 6.39*	65.28 ± 7.64*

注:与对照组比较,*P < 0.05



注：M 为 Marker；1 为对照组；2 为益气养阴组；3 为扶正组；4 为祛邪组

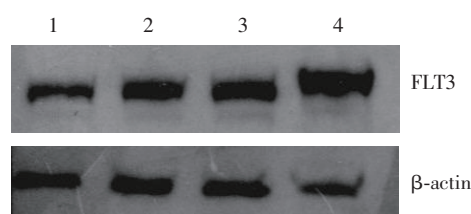
图 1 各组 FIt3 和 N-ras 基因表达

2 各组 FLT3 蛋白表达比较(表 3,图 2) 与对照组比较,3 个中药组均可降低 FLT3 蛋白表达水平($P < 0.01$);与益气养阴组比较,扶正组、祛邪组 FLT3 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$);而扶正组与祛邪组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组 FLT3 蛋白表达比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	FLT3/ β -action
对照	60	0.8127 $\pm$ 0.0284
益气养阴	60	0.4265 $\pm$ 0.0353*
扶正	60	0.5396 $\pm$ 0.0274* Δ
祛邪	60	0.5473 $\pm$ 0.0282* Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与益气养阴组比较, $\Delta P < 0.01$



注:1 为益气养阴组;2 为扶正组;3 为祛邪组;4 为对照组

图 2 各组 FLT3 阳性条带

讨 论

FIt3 基因和 N-ras 基因突变均可使 Ras-ERK(细胞外信号调节激)/ MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)信号转导途径失控,使肿瘤细胞恶性增殖、凋亡受抑,分化停滞,在 AML 发病机制中有协同作用,二者在白血病信号传导通路中占有重要地位^[4,5]。

中医学认为,白血病属于伏气温病范畴。肝肾阴虚、营卫气虚,瘟毒攻注于骨髓,造血功能异常,白细胞系统发生原始幼稚性改变,产生白血病细胞。白血病的发生,不仅仅是细胞失控增生,同时还存在恶性细胞凋亡过程严重受阻,导致细胞增殖、分化、凋亡出现失衡。细胞凋亡是调节体内细胞数量的生理机制之一,而细胞凋亡受阻是白血病发病机制之一。益气养阴方是治疗白血病的一个经验方,临床缓解率达 70 %^[6]。益气养阴方从扶正固本、解毒祛邪两方面遣方用药。

方中黄芪、太子参、白术、茯苓、天冬、麦冬、黄精益气养阴固本。《脾胃论》:“脾是元气之本,元气是健康之本”。其中黄芪、太子参、白术、茯苓益气健脾,培补中焦,以资气血生化之源,《日华子本草》谓黄芪能“破癥瘕”,白术治“痰癖气块,妇人冷癥瘕”;天冬、麦冬甘寒清润养阴润燥除烦;黄精,性味甘平,归肺脾肾经,《本草纲目》:“补诸虚……填精髓”,《本草正义》:“补血补阴而养脾胃是其专长”;女贞子、旱莲草归肝肾经,均能补益肝肾之阴,旱莲草亦可凉血止血;生地苦寒,归心肝肾经,既能清热凉血,又能养阴生津。三药既能加强益气养阴的功效,亦能止血。白花蛇舌草、半枝莲、小蓟、蒲公英,苦寒,清热解毒,活血化癖,消肿,利水通淋,甘草调和诸药。该方可抑制白血病细胞增殖,提高化疗药物对白血病细胞的杀伤作用,减轻肝肾功能损伤,改善全身症状。益气养阴方可使白血病细胞阻滞在 S 期,诱导白血病细胞凋亡,这可能是该方治疗白血病的作用之一^[7]。

该研究通过对 60 例 AML 患者骨髓单个核细胞 FIt3 和 N-ras 基因表达的结果显示,FIt3 和 N-ras 基因在 AML 患者表达阳性率很高。益气养阴组白血病细胞 FIt3 和 N-ras 基因的表达显著降低,与扶正组、祛邪组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),扶正组与祛邪组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。中药还可降低 FLT3 蛋白表达水平,益气养阴组与其拆方的扶正组、祛邪组比较,FLT3 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。为临床中药益气养阴方治疗 AML 提供了实验依据。

益气养阴方体外诱导白血病细胞凋亡可能是通过下调 FIt3 和 N-ras 基因的表达,使信号转导途径失控,抑制 AML 细胞的恶性增殖来实现的,提示该方诱导凋亡可能与调控白血病干细胞 FIt3 和 N-ras 基因表达之间存在密切联系。本研究为设计作用于新靶点的抗肿瘤中药,筛选有效降低白血病基因表达的中药提供了新的思路和方法,为中医药调控干预白血病干细胞的靶向治疗提供了可靠依据。益气养阴方是一个复方制

剂,组成中含有大量生物活性物质,成分较为复杂,还需进一步分析研究,确定其实际发挥作用的有效成分。

参 考 文 献

- [1] Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, et al. Biologic and clinical significance of the Flt3 transcript level in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2004, 103(5):1901-1908.
- [2] Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DI, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2001, 97(1):89-94.
- [3] Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia[J]. Blood, 2002, 100(5):1532-1542.
- [4] 许钢. ERK/ MAPK 信号转导途径在急性髓系白血病发病机制中的作用[J]. 临床医药实践杂志, 2007, 16(11):1054-1056.
XU G. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signaling pathway in acute myeloid leukemia cells [J]. Proc Clin Med, 2007, 16(11):1054-1056.
- [5] Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, et al. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia[J]. Eur J Haematol, 2009, 83(2):90-98.
- [6] 徐瑞荣, 顾振东, 焦中华, 等. 中医辨证分型配合 HA 方案治疗急性非淋巴细胞性白血病 50 例[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(5):302-303.
Xu RR, GU ZD, Jiao ZH, et al. Study on TCM type of syndrome and its basis combined with HA as induction therapy in acute myeloid leukemia curing 50 patients[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 1995, 15(5):302-303.
- [7] 李震, 臧运华, 李洁, 等. 益气养阴方对白血病 K562 细胞周期和凋亡率及细胞膜流动性的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2004, 11(1):55-57.
Li Z, Zang YH, Li J, et al. Effects of reinforcing qi nourishing on the cell cycle of leukemia cell lines K562 and apoptosis and the membrane fluidity[J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2004, 11(1):55-57.

(收稿:2008-12-08 修回:2010-03-30)

首届全国中西医结合防治变态反应疾病中青年学术论坛会议通知(第二轮)

为了加强变态反应领域中青年医师的学术交流,促进变态反应学术的发展,由中国中西医结合学会变态反应专业委员会主办、京城皮肤病医院承办的“首届全国中西医结合防治变态反应疾病中青年学术论坛”定于 2010 年 8 月 7—8 日在北京召开。

大会主题:融古论今、中西结合。大会宗旨:面向临床、开拓创新。大会将邀请变态反应领域(包括变态反应科、皮肤科、呼吸科、耳鼻咽喉科、小儿科、免疫科及针灸等)的国内外知名学者,就最新进展以及热点问题专题进行讲座和学术交流;同时举办中青年沙龙,为中青年学者进行学术交流,展示风采,搭建平台。现将会议有关事项通知如下。

1 基本信息 (1)会议时间:2010 年 8 月 7—8 日;(2)会议地点:北京国际亚奥酒店(暂定);(3)主办单位:中国中西医结合学会变态反应专业委员会;(4)承办单位:京城皮肤病医院;(5)会议注册:本次会议免收注册费。

2 注意事项 (1)2010 年 8 月 6 日 20 时召开青年委员工作会议,届时增补新任委员。现任青年委员和增补的青年委员务必参会。(2)中青年学术沙龙以难治病案报告为主,有意汇报病案者请于 2010 年 6 月 30 日之前报名,以便会议统一安排。(3)本次会议暂定在北京国际亚奥酒店举行。会议代表的食宿由会议统一安排,免收餐费,交通及住宿费自理。住宿安排北京国际亚奥酒店及七天连锁酒店。请参会代表务必于 2010 年 7 月 15 日前报名,注明住宿要求,电话、E-mail 以及回执表报名均可。邮寄报名表请注明 8 月 8 日会议。逾期报名者或现场报名者住宿不能保证,敬请谅解。

3 会议联系方式 (1)会议专用 E-mail:bjjcpfbuy@sina.com;(2)联系人:林开金,13811805066,010-64870888 转 8880;范雪梅,13910766681,010-64870888 转 8881;(3)通信地址:北京市朝阳区德胜门外双泉堡甲 4 号(邮编 100085)北京京城皮肤病医院。