

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.12.012

微残清方对急性髓系白血病模型小鼠骨髓苹果酸酶2介导的骨髓免疫代谢平衡的影响

范晨阳, 闫理想, 郝晓钢, 周欣丽, 热爱拉·加那提, 郭奕飞, 朱赓达, 史哲新✉

天津中医药大学第一附属医院/中医国家临床医学研究中心, 天津市西青区昌凌路88号, 300380

[摘要] **目的** 基于苹果酸酶2 (ME2) 介导的骨髓免疫代谢稳态探讨微残清方联合化疗治疗急性髓系白血病 (AML) 可能的作用机制。**方法** 65只雄性C57BL/6N小鼠随机分为对照组、模型组、微残清方组、西药化疗组、微残清方联合化疗组, 每组13只。除对照组外, 其余四组小鼠于实验第1天尾静脉注射C1498细胞 (每只约 1×10^6 个) 制备AML小鼠模型。实验第8天开始, 西药化疗组及微残清方联合化疗组小鼠给予阿糖胞苷 $30 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 皮下注射, 每日1次, 连续3天; 微残清方组、微残清方联合化疗组小鼠均予以微残清方 $7.54 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 每日1次, 连续21天。各组分别于实验第1、7、14、21、28天检测小鼠血红蛋白 (Hb)、白细胞计数 (WBC); 实验第28天取材, 采用吉姆萨染色观察骨髓细胞形态学变化; 流式细胞术检测各组小鼠骨髓T淋巴细胞亚群 CD8^+ 、 CD4^+ 、调节性T淋巴细胞 (Treg) 水平; 采用可见分光光度法检测骨髓中谷氨酰胺 (Gln)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸辅酶 (NADP⁺) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 含量; 使用化学发光法检测骨髓中三磷酸腺苷 (ATP) 浓度; RT-qPCR法检测骨髓苹果酸酶2 (ME2) mRNA表达水平; Western Blot法检测骨髓ME2蛋白表达水平。**结果** 与对照组同时间比较, 模型组小鼠第14、21、28天Hb水平均降低, 第7、14、21、28天时小鼠WBC水平均升高 ($P < 0.05$); 第28天时骨髓 CD8^+ 、 $\text{CD8}^+/\text{CD4}^+$ 降低, 骨髓Treg、ATP、Gln、NADP⁺、NADPH、ME2 mRNA及其蛋白水平均升高 ($P < 0.05$)。与模型组同时间比较, 西药化疗组和微残清方联合化疗组第14、21、28天时小鼠Hb水平均降低, 第28天时WBC水平升高; 微残清方联合化疗组小鼠骨髓 CD8^+ 水平升高, Treg水平降低, ATP、Gln、NADPH含量降低, ME2 mRNA表达及其蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。与西药化疗组同时间比较, 第21、28天时微残清方联合化疗组Hb升高, 第14、28天时WBC升高 ($P < 0.05$)。骨髓涂片病理显示, 模型组骨髓细胞胞质可见代谢异常空泡的髓系原始细胞; 西药化疗组和微残清方联合化疗组可见大量晚幼和杆状核粒细胞和极少量原始粒细胞。**结论** 微残清方可能通过调节ME2水平抑制骨髓代谢能量竞争, 重塑骨髓T淋巴细胞亚群分布, 从而辅助西药化疗改善AML预后。

[关键词] 急性髓系白血病; 免疫代谢稳态; 苹果酸酶2; 骨髓T细胞亚群; 微残清方

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一种致命的血液系统恶性肿瘤, 其发病迅速, 致死率高, 有严重的感染、贫血和出血风险^[1]。针对血液肿瘤的免疫疗法, 如靶向CD33、CD123的抗体治疗、嵌合抗原受体T细胞免疫疗法 (CAR-T)、免疫检查点抑制剂等总体疗效有限, 远未达到其在

B细胞系恶性肿瘤中的治疗水平^[2], 亟须突破AML治疗瓶颈。研究^[3]发现, 代谢物通过调控免疫影响肿瘤的发生发展, 与AML的发病密切相关, 其中苹果酸酶2 (ME2) 活性增强可通过加速三羧酸循环通量导致白血病细胞更多摄取丙酮酸及谷氨酰胺参与能量代谢, 致使骨髓免疫微环境受累, 从而影响白血病细胞的凋亡。

中医学认为, AML因精气亏虚导致髓海空虚, 邪毒深伏于髓内日久化为浊邪, 与痰、瘀、毒等病

基金项目:天津市名中医传承工作室建设项目(2024年)(tjmyz2406); 天津中医药大学研究生科研创新项目(YJSKC20240020); 天津市卫生健康委员会中医中西医结合科研课题(2023130)

✉ 通讯作者: shzhx0604@163.com

理因素相互搏结, 变生“髓浊”, 其具有藏伏、缠绵、流注的隐匿特性^[4]。微残清方为第七批全国老中医药专家学术继承工作指导老师杨文华经验方^[5], 全方攻补兼施, 顾护正气, 具有益气养阴、罢浊涤髓的功效。前期临床研究^[6]显示, 微残清方联合化疗可提高 AML 的临床疗效及患者对化疗药物的敏感性。本研究以 ME2 为切入点, 探讨微残清方辅助化疗治疗 AML 的可能作用机制, 为其临床应用提供实验依据。本研究通过中国医学科学院放射医学研究所伦理委员会批准, 伦理审批号: IRM/2-IACUC-2504-006。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞株

SPF 清洁级雄性 C57BL/6N 小鼠 65 只, 7 周龄, 体质量 20~22 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物许可证号为 SCXK (京) 2024-0003。饲养于中国医学科学院放射医学研究所 SPF 级动物房, 室温 22~24 °C, 相对湿度为 40%~60%, 12 h 交替照明, 饮水不限, 自由摄食。鼠源 AML 细胞 C1498 购于海星生物科技有限公司。

1.2 药物

微残清方组成: 当归 6 g, 黄芪 30 g, 女贞子 10 g, 墨旱莲 10 g, 全蝎粉 1 g, 青黛粉 0.9 g, 雄黄粉 0.1 g, 以上药物均购自天津中医药大学第一附属医院。当归、黄芪、女贞子、墨旱莲由天津中医药大学第一附属医院中药制剂实验室配制成 1 g/ml 的药液, 再兑入全蝎、青黛、雄黄粉末。最后罐装于 250 ml 的输液瓶中, 于 105 °C 流通蒸汽灭菌, 备用。注射用阿糖胞苷 (批号: 6J4478, 辉瑞制药有限公司), 用无菌生理盐水配制为 6 mg/ml 的混悬液。

1.3 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基 (货号: C11995500BT)、胎牛血清 (货号: 10099-141)、青霉素-链霉素溶液 (货号: 15140122), Gibco 公司; 吉姆萨染色液 (货号: C0131)、三磷酸腺苷 (ATP) 检测试剂盒 (货号: S0027)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸辅酶 II [NADP (H)] 含量检测试剂盒 (货号: BC1105), 上海碧云天生物技术有限公司; 谷氨酰胺 (Gln) 含量检测试剂盒 (货号: BC5300), 北京索莱宝科技有限公司; CD45 抗体 (货号: 103107)、CD3 抗体 (货号: 100214)、CD8 抗体 (货号: 155014)、CD4 抗体 (货号: 100559)、CD25 抗体 (货号: 102012)、叉头框蛋白 3 (FOXP3) 抗体 (货号:

126404), Biolegend 公司; FOXP3 固定破膜缓冲液 (货号: 00-5523-00), eBioscience 公司; 抗 ME2 抗体 (货号: ab139686), Abcam 公司; 微量总 RNA 提取试剂盒 (货号: R6812), Omega Bio-tek 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒 (货号: QP-0101T), FOREGENE 公司; 羊抗兔 IgG 二抗 HRP 偶联物 (货号: L3012), 美国 SAB 公司; 抗 β -actin (货号: 66009), Proteintech 公司; 两步法 RT-PCR 试剂盒 (货号: RT-01032), With gDNase 公司; RIPA 裂解液 (货号: PC101)、BCA 检测试剂盒 (货号: ZJ101), 上海雅酶生物医药科技有限公司; PVDF 膜 (货号: IPVH00010), Merck 公司。

全自动血常规检测仪 (型号: XT-2000iv), 日本西森美康公司; 小动物麻醉机 (型号: Matrix VIP 3000), Midmark 公司; 低速离心机 (型号: KDC-40), 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 流式细胞仪 (型号: BriCyte E6), 深圳迈瑞生物医疗有限公司; 96 孔半裙边 PCR 板 (型号: PP-96-HS-LC480-W), LABSELECT 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (型号: LightCycler 96), Roche 公司; 多功能化学发光成像系统 (型号: ChemiScope6100), 上海勤翔科学仪器有限公司。

1.4 造模方法

传代培养鼠源 AML 细胞 C1498 至第 3 代, 与无菌 PBS 重悬, 实验第 1 天将 100 μ l 的 C1498 细胞悬液经尾静脉注入小鼠体内 (每只约 1×10^6 个)^[7]。注射后用无菌海绵按压注射点, 防止出血。注射当天开始连续 3 天取外周血, 测血常规白细胞计数 (WBC) $\geq 20 \times 10^9/L$, 于实验第 7 天镜下观察小鼠股骨骨髓涂片, 镜下原始细胞比例占总细胞数的 20% 以上, 评估为造模成功^[8]。

1.5 动物分组与干预方法

将 65 只小鼠采用随机数字表法分为空白对照组、模型组、微残清方组、西药化疗组、微残清方联合化疗组, 每组 13 只。除空白对照组外, 其余各组建立 AML 小鼠模型。实验第 8 天开始, 西药化疗组及微残清方联合化疗组小鼠给予阿糖胞苷 30 mg/(kg·d) 皮下注射, 其他 3 组予 5 ml/(kg·d) 生理盐水皮下注射, 每日给药 1 次, 连续 3 天。根据小鼠与成人的体表面积折合换算^[9], 微残清方组、微残清方联合化疗组小鼠均予以微残清方 7.54 g/(kg·d) 灌胃, 其他 3 组予相同体积生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 21 天, 至实验第 28 天。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 外周血常规检测 各组分别于实验第 1、7、14、21、28 天用无菌注射器抽取小鼠尾静脉血 150 μ l, 应用全自动血常规检测仪, 检测血红蛋白 (Hb)、WBC 水平。

1.6.2 骨髓吉姆萨染色 实验第 28 天, 各组小鼠麻醉并处死, 抽吸股骨骨髓, 每组按随机数字表法选取小鼠骨髓样本进行指标检测。每组选取 3 只小鼠骨髓细胞液轻柔地滴于无菌载玻片上, 用推片蘸取骨髓液推至载玻片底部后晾干。用 10% 乙醇溶液固定 10 min, 配制吉姆萨染色液, 染色 35 min, 用蒸馏水从玻片一侧流动洗涤, 晾干后, 置于光学显微镜下观察。

1.6.3 骨髓 T 淋巴细胞亚群流式检测 每组选取 3 只小鼠骨髓样本, 取 1×10^7 个骨髓细胞待测。CD45、CD3、CD8、CD4、CD25 流式抗体各 2 μ l, 加入 1 ml FOXP3 预冷固定/破膜液和 2 ml 破膜液, 离心弃上清, 加入 2 μ l FOXP3 流式抗体, 避光, 4 $^{\circ}$ C, 孵育 40 min, 洗涤后重悬于流式缓冲液, 流式细胞仪检测。CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ 是小鼠调节性 T 细胞 (Treg) 的主要标志。数据记录使用 FlowJo v10 进行分析。

1.6.4 骨髓 Gln、ATP、NADP⁺ 和 NADPH 含量检测 采用可见分光光度法检测 3 只小鼠骨髓样本中 Gln、NADP⁺ 和 NADPH 含量, 运用化学发光法计算 ATP 浓度, 操作严格按照试剂盒说明书执行。

1.6.5 RT-qPCR 检测骨髓 ME2 mRNA 表达 每组选取 3 只小鼠的骨髓细胞悬液, 严格按照提取试剂盒说明书提取总 RNA, 测定 RNA 浓度, 使用桌面低速离心机瞬离后, 反转录为 cDNA。将配制好的反应体系离心混匀 (4 $^{\circ}$ C、3000 $\times g$ 离心 1 min), 采用三步法, 扩增反应条件如下: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 3 min; 循环 (40 次) 95 $^{\circ}$ C, 10 s $\rightarrow$ 56 $^{\circ}$ C, 10 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 32 s; 熔解曲线 60 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C, 每 15 s 升温 0.3 $^{\circ}$ C。以 β -actin 为内参, 根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量计算出样本目的基因的相对表达量, 对数据进行归一化处理。PCR 引物由擎科生物工程股份有限公司合成, ME2: 上游 CTTGGCGATCTGGGTGTCTAT, 下游 GGAACGATCTCGCTTCTGATACA, 产物长度: 180 bp; β -actin: 上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC, 下游 TTTAATGTCACGCACGATTTC, 产物长度: 152 bp。

1.6.6 Western Blot 法检测骨髓 ME2 蛋白水平 每组选取 3 只小鼠的骨髓组织, 使用 RIPA 裂解液提取组织的可溶性蛋白, 使用 BCA 检测试剂盒测定

蛋白浓度。使用凝胶电泳将蛋白分离并转移到 0.45 μ m 的 PVDF 膜, 然后将 ME2 (1:1000)、 β -actin (1:20 000) 在 4 $^{\circ}$ C 下分别孵育过夜 (12~16 h), TBST 洗涤后孵育羊抗兔 IgG 二抗 (1:5000) 1 h。显影、曝光后采用 Image J 1.52 软件测定其灰度值, 计算其相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 27.0 统计软件分析数据, 计量数据符合正态分布以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐者多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 检验, 方差不齐使用 Games-Howell 检验; 非正态分布数据以中位数 (四分位数) [$M (P_{25}, P_{75})$] 表示, 用 Kruskal-Wallis 秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间外周血 Hb、WBC 水平比较

表 1、表 2 示, 与空白对照组同时间比较, 第 14、21、28 天时其余各组小鼠 Hb 水平均降低 ($P < 0.05$), 除西药化疗组和微残清方联合化疗组第 14 天外, 其余各组第 7、14、21、28 天时小鼠 WBC 水平均升高, 西药化疗组第 14 天 WBC 水平降低 ($P < 0.05$)。与模型组同时间比较, 西药化疗组和微残清方联合化疗组第 14、21、28 天时小鼠 Hb 水平均降低 ($P < 0.05$); 各药物干预组第 14 天时 WBC 水平均降低, 第 28 天时 WBC 水平升高 ($P < 0.05$)。与微残清方组同时间比较, 西药化疗组、微残清方联合化疗组第 14、21、28 天时 Hb 水平均降低, 第 14 天时 WBC 水平降低; 西药化疗组 28 天时 WBC 降低 ($P < 0.05$)。与西药化疗组同时间比较, 第 21、28 天时微残清方联合化疗组 Hb 升高, 第 14、28 天时 WBC 升高 ($P < 0.05$)。

2.2 各组小鼠骨髓涂片病理结果比较

图 1 示, 空白对照组镜下可观察到胞体呈圆形或椭圆形, 胞核呈深紫红色, 核染色质粗糙不匀, 浓缩成块状, 核形多弯曲似腊肠状或分为 2~5 叶, 细胞质丰富, 充满细小的紫红色中性颗粒。模型组和微残清方组镜下可观察到聚集的圆形或类圆形, 核大, 居中或偏位, 核染色质疏松呈细颗粒状, 平坦如薄沙样, 胞质量较少, 呈蓝色或灰蓝色, 胞质可见代谢异常空泡的髓系原始细胞, 原始细胞占镜下总细胞数比例的 20% 以上, 表示骨髓未缓解。西药化疗组和微残清方联合化疗组可见大量细胞核明显凹陷呈马蹄形或弯曲似腊肠状, 核染色质较粗

表 1 各组小鼠不同时间外周血 Hb 水平比较

Table1 Comparison of peripheral Hb levels among groups at different timepoints (g/L, $\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
空白对照组	13	163.40±11.35	139.43±14.55	140.50±18.63	141.75±17.97	155.75±8.30
模型组	13	161.60±12.24	133.70±19.75	104.40±12.14 ^{a)}	116.50±14.15 ^{a)}	109.75±16.56 ^{a)}
微残清方组	13	165.60±6.19	144.10±19.23	109.20±14.52 ^{a)}	104.60±14.12 ^{a)}	113.20±4.15 ^{a)}
西药化疗组	13	158.80±5.50	132.10±15.01	30.20±8.61 ^{a) b) c)}	27.50±13.83 ^{a) b) c)}	45.00±4.55 ^{a) b) c)}
微残清方联合化疗组	13	161.40±10.38	139.70±15.69	37.70±18.26 ^{a) b) c)}	45.70±20.82 ^{a) b) c) d)}	63.80±7.98 ^{a) b) c) d)}

注：Hb，血红蛋白。

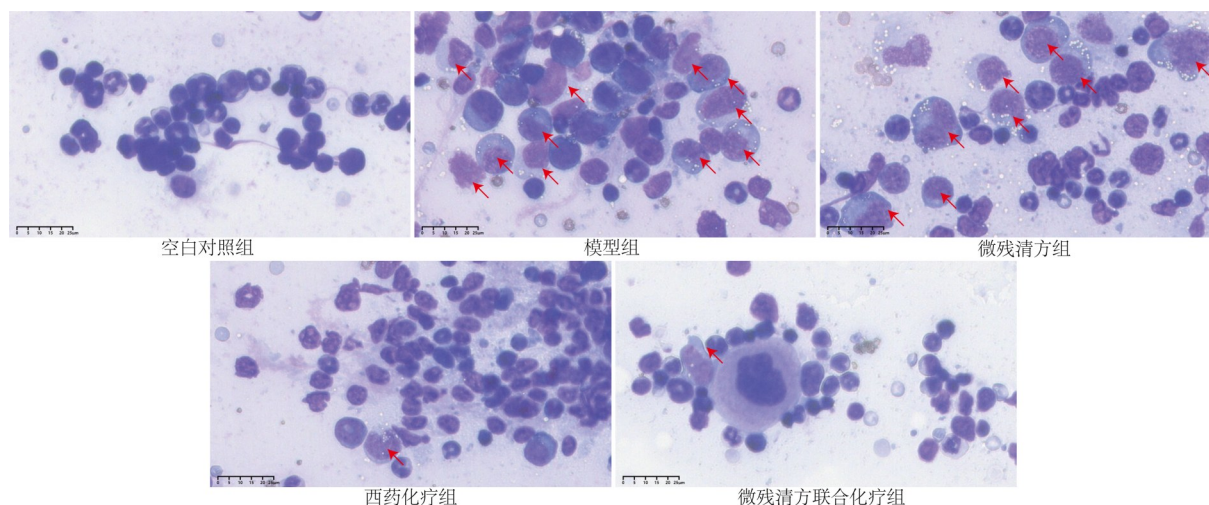
a) 与空白对照组同时间比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；c) 与微残清方组同时间比较， $P<0.05$ ；d) 与西药化疗组同时间比较， $P<0.05$ 。

表 2 各组小鼠不同时间外周血 WBC 水平比较

Table1 Comparison of peripheral WBC levels among groups at different timepoints ($\times 10^9/L$, $\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
空白对照组	13	7.50±0.91	6.75±1.18	8.70±1.57	7.71±1.23	6.73±0.43
模型组	13	7.36±1.04	21.52±3.18 ^{a)}	23.75±4.24 ^{a)}	5.33±1.13 ^{a)}	2.37±0.45 ^{a)}
微残清方组	13	8.16±0.94	20.41±0.97 ^{a)}	13.79±1.27 ^{a) b)}	4.80±0.48 ^{a)}	4.74±0.21 ^{a) b)}
西药化疗组	13	7.48±0.77	21.81±2.37 ^{a)}	5.78±0.93 ^{a) b) c)}	5.27±1.11 ^{a)}	3.10±0.57 ^{a) b) c)}
微残清方联合化疗组	13	7.62±0.77	21.41±1.64 ^{a)}	8.33±1.32 ^{b) c) d)}	5.34±0.75 ^{a)}	4.71±0.50 ^{a) b) d)}

注：WBC，白细胞计数。

a) 与空白对照组同时间比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；c) 与微残清方组同时间比较， $P<0.05$ ；d) 与西药化疗组同时间比较， $P<0.05$ 。



注：图中红色箭头示髓系原始细胞。

图 1 各组小鼠骨髓涂片吉姆萨染色病理结果 (×80)

Figure 1 Gimsa-stained bone marrow smear pathological findings for each group of mice (×80)

糙的晚幼和杆状核粒细胞，同时可见极少量原始粒细胞，占总细胞数比例的 5% 以下，提示骨髓缓解，并且两组无显著差异。

2.3 各组小鼠骨髓 CD8⁺、CD4⁺、CD8⁺/CD4⁺、Treg 水平比较

表 3 示，与空白对照组比较，模型组小鼠骨髓 CD8⁺、CD8⁺/CD4⁺降低，Treg 水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，微残清方联合化疗组小鼠骨髓

CD8⁺水平升高，Treg 水平降低 ($P<0.05$)，微残清方组和西药化疗组小鼠骨髓 CD8⁺、CD4⁺、CD8⁺/CD4⁺和 Treg 水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各药物干预组小鼠骨髓 CD8⁺、CD4⁺、CD8⁺/CD4⁺和 Treg 水平差异亦无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组小鼠骨髓 ATP、Gln、NADP⁺、NADPH 含量比较

表 4 示，与空白对照组比较，模型组和微残清

表3 各组小鼠骨髓CD8⁺、CD4⁺、CD8⁺/CD4⁺、Treg水平比较
Table 3 Comparison of bone marrow CD8⁺, CD4⁺, CD8⁺/CD4⁺, and Treg levels in mice of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /CD4 ⁺	Treg/%
空白对照组	3	13.02±4.50	9.16±1.93	1.46±0.58	2.03±0.60
模型组	3	6.55±2.20 ^{a)}	9.93±3.75	0.67±0.18 ^{a)}	2.74±0.52 ^{a)}
微残清方组	3	8.65±2.45	12.33±5.93	0.82±0.38	2.26±0.70
西药化疗组	3	9.69±1.23	10.42±4.16	1.01±0.27	2.12±0.59
微残清方联合化疗组	3	11.51±1.73 ^{b)}	11.59±3.04	1.01±0.16	1.98±0.18 ^{b)}

注：Treg，调节性T淋巴细胞。
a) 与空白对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

表4 各组小鼠骨髓ATP、Gln、NADP⁺、NADPH含量比较
Table 4 Comparison of ATP, Gln, NADP⁺, and NADPH in the bone marrow of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ATP/ $\mu\text{M}, M(P_{25}, P_{75})$	Gln/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg prot}^{-1}, M(P_{25}, P_{75})$	NADP ⁺ /nmol $\cdot 10^4\text{ cells}^{-1},$ $M(P_{25}, P_{75})$	NADPH/ nmol $\cdot 10^4\text{ cells}^{-1}, \bar{x}\pm s$
空白对照组	3	34.43 (31.60, 38.11)	0.01 (0.01, 0.03)	0.39 (0.35, 0.42)	0.16±0.05
模型组	3	171.18 (153.06, 193.82) ^{a)}	0.21 (0.12, 0.42) ^{a)}	6.15 (5.38, 6.76) ^{a)}	3.04±0.78 ^{a)}
微残清方组	3	116.83 (106.27, 127.40) ^{a)}	0.06 (0.04, 0.08)	5.53 (4.20, 5.65)	2.26±0.72 ^{a)}
西药化疗组	3	54.39 (50.71, 58.76)	0.07 (0.04, 0.08)	1.93 (1.57, 2.17)	0.96±0.29 ^{b) c)}
微残清方联合化疗组	3	47.11 (40.18, 52.06) ^{b)}	0.04 (0.02, 0.05) ^{b)}	1.90 (1.61, 2.16)	0.85±0.41 ^{b) c)}

注：ATP，三磷酸腺苷；Gln，谷氨酰胺；NADP⁺，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸辅酶；NADPH，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。
a) 与空白对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与微残清方组比较， $P<0.05$ 。

方组骨髓ATP、NADPH含量水平均升高，模型组骨髓Gln、NADP⁺含量亦升高（ $P<0.05$ ）。与模型组和微残清方组比较，西药化疗组和微残清方联合化疗组NADPH含量均降低，（ $P<0.05$ ）。微残清方联合化疗组ATP、Gln含量亦低于模型组（ $P<0.05$ ）。西药化疗组和微残清方联合化疗组ATP、Gln、NADP⁺和NADPH含量差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

2.5 各组小鼠骨髓ME2 mRNA及蛋白水平比较

表5示，与空白对照组比较，模型组ME2 mRNA及蛋白相对表达量上升（ $P<0.05$ ）；微残清方联合化疗组ME2 mRNA表达较模型组降低，ME2

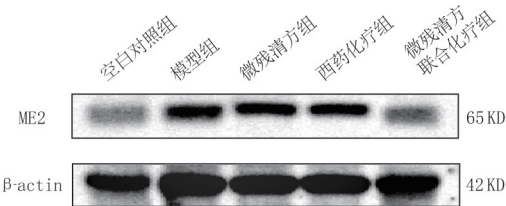
表5 各组小鼠骨髓ME2 mRNA及其蛋白水平比较

Table 5 Comparison of ME2 mRNA and protein expression levels in the bone marrow of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ME2 mRNA	ME2蛋白相对表达量
空白对照组	3	1.00±0.00	1.00±0.18
模型组	3	1.98±0.99 ^{a) b)}	1.45±0.29 ^{a) b)}
微残清方组	3	1.52±0.53	1.44±0.35 ^{b)}
西药化疗组	3	1.07±0.25	1.19±0.02 ^{b)}
微残清方联合化疗组	3	0.98±0.33	0.73±0.25

注：ME2，苹果酸酶2。
a) 与空白对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与微残清方联合化疗组比较， $P<0.05$ 。

蛋白相对表达量低于模型组、微残清方组、西药化疗组（ $P<0.05$ ）。各组小鼠骨髓ME2蛋白电泳图见图2。



注：ME2，苹果酸酶2。
图2 各组小鼠骨髓ME2蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoresis of ME2 protein in bone marrow of mice in each group

3 讨论

根据临床表现，可将AML归属于中医学“血证”“虚劳”“急劳”“温热病”等范畴，现代医家统称其为急髓毒病^[10]，以示病情凶险。髓毒急发，髓不化血，加之药毒损伤，每致患者阴阳气血均虚，正虚无以奋起抗邪，体弱不耐药物攻伐，精气亏虚导致髓海空虚，致使体内髓毒化浊难以肃清。因此，精亏、髓空、浊注为AML缠绵难愈的病机。微残清方中君以黄芪、当归补益气血；臣以全蝎、青黛、雄黄，其中全蝎以毒攻毒，祛风性走窜，防治髓浊流注，雄黄、青黛一热一寒，相反相成，化瘀凉血；佐以女贞子、墨旱莲益气养阴，助君药加

强顾护正气之力。诸药合用,攻补兼施,补精髓而复正气,罢髓浊而防流注。本研究选择 AML 经典一线药物大剂量阿糖胞苷为阳性对照药^[8],应用 C1498 造模的 C57 小鼠模型为最常见的研究 AML 免疫的模型^[11]。AML 病情极重,若不加以药物干预,易出现壮热症状,与“温病”“热劳”的记载相似^[10],使患者在疾病后期出现白细胞持续降低直至粒细胞缺乏的症状。化疗后骨髓缓解情况为判断疾病预后的金标准。另外,阿糖胞苷在抗肿瘤的同时易引起全血细胞减少^[12]。本研究结果显示,西药化疗组和微残清方联合化疗组小鼠在骨髓形态学缓解的基础上,WBC 计数在药物干预 7 天后率先降低,并维持在正常范围内,无进一步降低至粒细胞缺乏的趋势。其中,微残清方联合化疗组较西药化疗组小鼠 Hb 水平高,但未达到重度贫血的水平,证实微残清方联合化疗具有显著的治疗效果。

骨髓内代谢能量是维持骨髓免疫功能的物质基础,而三羧酸(TCA)循环是代谢反应的主要枢纽^[13]。生理情况下,各个细胞中线粒体 TCA 循环通量和 ATP 生成是具备刺激感应性的,为抑制白血病细胞增殖,能量更多流向免疫细胞。而在 AML 复发的骨髓代谢重构中,这种刺激感应遭到破坏,线粒体损伤,ATP 产生及利用紊乱,终致骨髓微环境处于代谢紊乱、免疫缺失状态^[14]。因此,调控能量代谢可以使白血病细胞的能量利用率降低,抑制其恶性增殖,使化疗后骨髓免疫微环境得到修复,增强免疫效应,从而抑制残留白血病细胞免疫逃逸,改善 AML 预后。T 细胞是免疫系统的核心^[15],并且骨髓 T 细胞亚群分布相比外周血不同,呈现 CD8⁺/CD4⁺为 2:1 的 CD8⁺细胞毒性 T 淋巴细胞高比例状态,骨髓中靶向白血病细胞主要依赖 CD8⁺ T 淋巴细胞^[16]。研究^[17]发现,肿瘤通过竞争性夺取葡萄糖来抑制 CD8⁺ T 淋巴细胞功能,诱导 T 细胞耗竭。除此之外,白血病细胞和免疫细胞对 Gln 和其他代谢物的竞争性摄取以及细胞内外相应转运蛋白的表达也是影响免疫细胞功能的关键因素^[18]。白血病细胞对营养物质过度竞争导致细胞内线粒体 TCA 循环加剧,ATP 生成过量,而 CD8⁺ T 淋巴细胞能量不足,进而导致骨髓免疫效能缺失,最终诱使疾病恶病质^[19]。骨髓中 Treg 含量高于人体其他部位^[20]。生理状态下,Treg 可调节 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞免疫反应、控制免疫耐受、防止免疫过度损伤机体^[21]。而在 AML 骨髓微环境中,Treg 占据主导地位,使效应部 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴

细胞、Th1 耗竭或功能失调,这种骨髓免疫功能受抑导致 AML 进展的病理状态^[22]。本研究取小鼠骨髓进行代谢物水平及 T 细胞亚群的检测。结果显示,微残清方联合化疗组骨髓内 ATP、Gln、NADP⁺ 和 NADPH 水平较模型组显著降低,骨髓 CD8⁺ T 淋巴细胞比例显著升高,Treg 细胞比例显著降低,纠正骨髓免疫抑制偏倚,使各亚群分布趋向正常骨髓免疫稳态。单用微残清方未能显著逆转骨髓免疫抑制或能量代谢紊乱,其 CD8⁺、Treg 水平及 ATP、NADPH 含量与模型组差异无统计学意义,提示单纯中药干预在纠正 AML 骨髓微环境失衡方面作用有限。单用化疗虽能降低 NADPH 含量,但对 Treg 等免疫抑制指标的改善同样不显著,反映出化疗代谢调节与免疫重塑效应分离,可能限制其远期获益。联合用药组 CD8⁺ 升高,Treg、ATP、Gln、NADPH 降低,表明中药辅助化疗可协同改善免疫抑制与高代谢状态,部分恢复骨髓免疫代谢稳态。该结果证实微残清方联合化疗可能改善 AML 骨髓免疫代谢紊乱,可为微残清方联合化疗克服 AML 免疫逃逸及代谢重编程提供实验依据。

ME2 是受 p53 负调控的代谢关键酶,ME2 缺乏可激活一磷酸腺苷活化蛋白,下调 E-钙黏蛋白及血清闭锁小带蛋白-1,促进 p53 磷酸化活化;同时增强对哺乳动物雷帕霉素靶标的负调控,并激活转录因子缺氧诱导因子-1 α 依赖性糖酵解,形成代谢-表观恶性循环,最终导致肿瘤细胞死亡^[19]。ME2 驱动 TCA 循环超负荷导致乳酸堆积和 α -酮戊二酸耗竭,诱导骨髓微环境酸中毒,抑制 CD8⁺ T 淋巴细胞功能^[23]。同时,ME2 过表达通过 p53-髓系细胞白血病 1(MCL1) 轴抑制线粒体凋亡,从而赋予白血病细胞化疗耐药性。此外,维持 ME2 高表达的甲基化修饰不仅稳定了其表达水平,还通过激活 ME2 的代谢功能促进癌细胞的增殖和转移^[24]。因此,ME2 在肿瘤进展中具有核心地位。本研究对各组 AML 小鼠骨髓的 ME2 mRNA 及蛋白水平进行检测,结果发现模型组 ME2 mRNA 及蛋白表达水平上调,提示 AML 骨髓存在代谢酶异常活化。微残清方组与西药化疗组 ME2 蛋白水平与模型组差异无统计学意义,微残清方联合化疗组 ME2 表达显著低于模型组及各单药组,说明微残清方联合化疗可协同下调 ME2,纠正肿瘤相关代谢重编程。由此证实,微残清方的中西医结合疗法可能通过调节 ME2 水平,间接纠正骨髓免疫代谢平衡,进而对 AML 起到治疗作用。

综上所述,微残清方联合化疗可能通过调控骨髓ME2蛋白水平,抑制AML骨髓代谢能量竞争,重塑骨髓T细胞亚群分布,纠正AML骨髓免疫代谢平衡,改善疾病预后。但本研究尚未对关键靶点的上下游通路进行验证,且未精确探究AML细胞和骨髓免疫细胞的代谢能量,未来将进一步增加关键通路的研究,同时进行体外实验对白血病细胞及免疫细胞之间的代谢竞争进行深入研究。

参考文献

- [1] SHIMONY S, STAHL M, STONE R M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management [J]. *Am J Hematol*, 2023, 98 (3): 502-526.
- [2] FRY T J. The Paradox of acute myeloid leukemia responsiveness to adoptive T-cell therapy [J]. *Blood Cancer Discov*, 2025, 6(3): 157-158.
- [3] SARFRAZ I, RASUL A, HUSSAIN G, et al. Malic enzyme 2 as a potential therapeutic drug target for cancer [J]. *IUBMB life*, 2018, 70(11): 1076-1083.
- [4] 张禹成, 闫理想, 陈猛, 等. 从“浊邪害清”论骨髓微环境与白血病的关系及中医辨治[J]. *北京中医药大学学报*, 2023, 46(10): 1467-1472.
- [5] 杨文华. 中医药治疗急性白血病述评[J]. *北京中医药大学学报*, 2023, 46(10): 1454-1460.
- [6] 闫理想, 姜静, 杨向东, 等. 微残清颗粒逆转复发/难治性急性髓系白血病(非APL)耐药的临床观察[J]. *天津中医药*, 2023, 40(3): 273-280.
- [7] DRISS V, LEPRÊTRE F, BRICHE I, et al. Sub-clonal analysis of the murine C1498 acute myeloid leukaemia cell line reveals genomic and immunogenic diversity [J]. *Immunol Lett*, 2017, 192: 27-34. doi: 10.1016/j.imlet.2017.10.004.
- [8] MOPIN A, DRISS V, BRINSTER C. A detailed protocol for characterizing the murine C1498 cell line and its associated leukemia mouse model [J]. *J Vis Exp*, 2016 (116): 54270.
- [9] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. *江西医学院学报*, 1997(4): 41.
- [10] 陈信义, 杨文华. 中医血液病学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2019, 72-73.
- [11] KIM D Y, LEE S, KIM D Y, et al. Effective murine model induction for niche study in immune cells against leukemia [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1232: 415-420. doi: 10.1007/978-3-030-34461-0_53.
- [12] 闵凯莉, 郑璇, 苏永锋, 等. 含维奈克拉化疗方案治疗高危急性髓系白血病的疗效和安全性分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2026, 34(2): 351-357.
- [13] MAHOR D, PANDEY R, BULUSU V. TCA cycle off, ATF4 on for metabolic homeostasis [J]. *Trend Bio Sci*, 2022, 47(7): 558-560.
- [14] BOSCH C, SALAND E, BOUSARD A, et al. Mitochondrial inhibitors circumvent adaptive resistance to venetoclax and cytarabine combination therapy in acute myeloid leukemia [J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(11): 1204-1223.
- [15] SHU P, LIANG H, ZHANG J, et al. Reactive oxygen species formation and its effect on CD4⁺ T cell-mediated inflammation [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1199233. doi: 10.3389/fimmu.2023.1199233.
- [16] COHEN A S, GENG L, ZHAO P, et al. Combined blockade of EGFR and glutamine metabolism in preclinical models of colorectal cancer [J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(10): 100828.
- [17] STUANI L, SABATIER M, SALAND E, et al. Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(5): e20200924.
- [18] HAO X, FAN C, YAN L, et al. Metabolic reprogramming and immune regulation in acute myeloid leukemia [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1655005. doi: 10.3389/fimmu.2025.1655005.
- [19] HSIEH J Y, CHEN K C, WANG C H, et al. Suppression of the human malic enzyme 2 modifies energy metabolism and inhibits cellular respiration [J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 548.
- [20] HIRATA Y, KAKIUCHI M, ROBSON S C, et al. CD150 high CD4 T cells and CD150 high regulatory T cells regulate hematopoietic stem cell quiescence via CD73 [J]. *Haematol*, 2019, 104(6): 1136-1142.
- [21] LECLERC M, VOILIN E, GROS G, et al. Regulation of antitumour CD8 T-cell immunity and checkpoint blockade immunotherapy by Neuropilin-1 [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3345.
- [22] MU X, CHEN C, DONG L, et al. Immunotherapy in leukaemia [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2023, 55(6): 974-987.
- [23] CHEN K C, HSIAO I H, HUANG Y N, et al. Targeting human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme (ME2) impairs energy metabolism and redox state and exhibits antileukemic activity in acute myeloid leukemia [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2023, 46(5): 1301-1316.
- [24] RATTIGAN K M, ZAROU M M, HELGASON G V. Metabolism in stem cell-driven leukemia: parallels between hematopoiesis and immunity [J]. *Blood*, 2023, 141(21): 2553-2565.

Effects of *Weicanqing Formula* (微残清方) on Malic Enzyme 2-Mediated Bone Marrow Immunometabolic Homeostasis in Acute Myeloid Leukemia Model Mice

FAN Chenyang, YAN Lixiang, HAO Xiaogang, ZHOU Xinli, Reaila Jianati, GUO Yifei, ZHU Gengda, SHI Zhexin

First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine/ National Clinical Research Center for Chinese Medicine, Tianjin, 300380

ABSTRACT **Objective** To explore the potential mechanism of *Weicanqing Formula* (微残清方, WF) combined with chemotherapy in treating acute myeloid leukemia (AML) based on malic enzyme 2 (ME2)-mediated bone marrow immune-metabolic homeostasis and . **Methods** Sixty-five male C57BL/6N mice were randomly divided into control group, model group, WF group, chemotherapy group, and the combination group (WF plus chemotherapy), with 13 mice per group. Except for the control group, mice were injected with C1498 cells (approximately 1×10^6 cells per mouse) via the tail vein on day 1 to establish an AML model. Starting from day 8, mice in the chemotherapy group and the combination group were administered with cytarabine at 30 mg/(kg·d) via subcutaneous injection, once daily for 3 consecutive days; WF group and the combination group received WF at 7.54 g/(kg·d) by gavage, once daily for 21 consecutive days. On days 1, 7, 14, 21 and 28, hemoglobin (Hb) and white blood cell (WBC) levels were determined in each group. On day 28, Giemsa staining was used to observe morphological changes in bone marrow cells. Flow cytometry was employed to detect the expression levels of bone marrow T lymphocyte subsets, including CD8⁺, CD4⁺, and regulatory T lymphocytes (Treg). The contents of glutamine (Gln), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) in bone marrow were determined using visible spectrophotometry. Adenosine triphosphate (ATP) concentration in bone marrow was measured by chemiluminescence assay. The mRNA expression of malic enzyme 2 (ME2) in bone marrow was detected by RT-qPCR, and the protein expression level of ME2 was determined by Western blotting. **Results** Compared to the control group, the model group showed decreased Hb levels on day 14, 21, and 28, and increased WBC levels on day 7, 14, 21, and 28 ($P < 0.05$). On day 28, bone marrow CD8⁺ and CD8⁺/CD4⁺ levels decreased, while Treg cells, ATP, Gln, NADP⁺, NADPH, ME2 mRNA, and their corresponding protein levels increased ($P < 0.05$). Compared to the model group, the chemotherapy group and the combination group both exhibited reduced Hb level on day 14, 21 and 28, as well as the increased WBC level; the combination group showed increased CD8⁺ level, decreased Treg, ATP, Gln, and NADPH content, as well as reduced ME2 mRNA expression and protein levels ($P < 0.05$). Compared to the chemotherapy group, the combination group showed significantly increased Hb level on days 21 and 28, and increased WBC level on day 28 ($P < 0.05$). Bone marrow smear pathology revealed that, in the model group, myeloid blast cells exhibited cytoplasmic vacuoles indicative of abnormal metabolic activity. In contrast, both the chemotherapy group and the combination group showed large numbers of metamyelocytes and band neutrophils, with only a few immature granulocytic blast cells observed. **Conclusion** WF may improve the prognosis of AML when used as an adjunct to chemotherapy by modulating ME2 expression, inhibiting metabolic energy competition within the bone marrow microenvironment, and reshaping the distribution of T lymphocyte subsets in the bone marrow.

Keywords acute myeloid leukemia; immunometabolic homeostasis; malic enzyme 2; bone marrow T-cell subpopulations; *Weicanqing Formula* (微残清方)

(收稿日期: 2025-11-19; 录用日期: 2025-12-22; 修回日期: 2026-04-13)

[编辑: 邓媛]