

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.01.015

益气养阴方及其拆方对急性髓细胞白血病小鼠骨髓细胞 hTERT 及其启动子甲基化表达的影响

徐瑞荣^{*}, 焦 宁², 陈 冲³, 王 琰¹, 罗雅琴¹

(1. 山东中医药大学附属医院, 山东省济南市文化西路 42 号, 250014; 2. 山东省淄博市中医医院; 3. 山东中医药大学临床医学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173442)

摘要 目的 探讨益气养阴方治疗急性髓细胞白血病的可能作用机制。方法 40 只 NOD-SCID 小鼠经⁶⁰Co 照射后, 尾静脉注射 KG1a 细胞 1×10^6 个, 建立急性髓细胞白血病动物模型后随机分成 4 组, 每组 10 只。模型组予生理盐水灌胃; 扶正组予扶正方浓缩药液 (1.08 g/ml) 灌胃; 祛邪组予祛邪方浓缩药液 (0.92 g/ml) 灌胃; 全方组予益气养阴方浓缩药液 (2 g/ml) 灌胃。各组均 0.2 ml/次, 每日 2 次, 共 28 天。采用 PCR-ELISA 法检测骨髓细胞端粒酶活性; 荧光定量 PCR 法检测人端粒酶逆转录酶 (hTERT) mRNA 及其启动子甲基化的表达。结果 扶正组、祛邪组和全方组小鼠骨髓细胞端粒酶活性、hTERT-mRNA 和 hTERT 启动子甲基化的表达较模型组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 全方组端粒酶活性、hTERT-mRNA 和 hTERT 启动子甲基化的表达低于扶正组与祛邪组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 益气养阴方治疗急性髓细胞白血病的机制可能与降低端粒酶活性、hTERT 及其启动子甲基化的表达水平有关。

关键词 益气养阴方; 急性髓细胞白血病; 人端粒酶逆转录酶; DNA 甲基化

白血病是一种涉及多种形式基因遗传学和表现遗传学改变的恶性血液肿瘤疾病, 我们临床治疗白血病采用疗效肯定的益气养阴方^[1], 全方以扶正祛邪为治法, 拆方后补益类药物模拟扶正治法, 清热凉血解毒类药物模拟祛邪治法。端粒酶是一种核蛋白复合体, 含有具有模板功能的 RNA, 能够逆转录合成端粒 DNA, 维持端粒长度, 延长细胞寿命^[2]。端粒酶的激活与肿瘤凋亡、增殖平衡失调密切相关, 端粒酶活性越强, 抗凋亡作用也越强^[3]。人端粒酶逆转录酶 (hTERT) 是端粒酶的核心部分, 其 mRNA 表达水平与端粒酶活性和细胞凋亡有关^[4]。DNA 甲基化是在 DNA 甲基转移酶的作用下, 将甲基基团转移到胞嘧啶和鸟嘌呤 (CpG) 二核苷酸的胞嘧啶中 5 位碳原子上, 人类许多恶性肿瘤的发生与甲基化异常有关^[5]。有研究表明, 启动子 CpG 岛高甲基化与 hTERT-mRNA

表达及端粒酶活性显著相关, 认为甲基化可能参与了 hTERT 的调节^[6]。本研究建立急性髓细胞白血病小鼠模型, 研究益气养阴方及其拆方对骨髓细胞端粒酶、hTERT 活性及其启动子甲基化的干预作用。

1 资料与方法

1.1 实验细胞与动物

KG1a 细胞株, 由山东大学齐鲁医院实验中心馈赠; SPF 级 NOD-SCID 小鼠 40 只, 雄性, 5 周龄, 体重 14 ~ 18 g, 购于中国科学院实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2009-0004, 适应性饲养 7 天后进行实验。

1.2 主要药品及试剂

益气养阴方: 太子参 30 g, 黄芪 30 g, 白术 10 g, 茯苓 10 g, 黄精 15 g, 生地黄 15 g, 女贞子 10 g, 墨旱莲 10 g, 麦冬 15 g, 白花蛇舌草 30 g, 半枝莲 30 g, 蒲公英 30 g, 牡丹皮 15 g, 甘草 10 g, 常压蒸发浓缩至 130 ml (浓度约 2 g/ml)。益气养

* 通讯作者: houqijiaoning@163.com, 15863775649

阴方拆方分为祛邪方和扶正方,祛邪方由生地黄、白花蛇舌草、半枝莲、蒲公英、牡丹皮组成,浓缩至 130 ml (浓度约 0.92 g/ml);扶正方由太子参、黄芪、白术、茯苓、麦冬、黄精、女贞子、墨旱莲、甘草组成,浓缩至 130 ml (浓度约 1.08 g/ml)。高压灭菌,4℃保存。

DMEM 高糖培养基:赛默飞世尔生物化学制品有限公司。Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS}试剂盒 (批号 12013789001):Roche 公司。DNA/RNA 提取试剂盒 (批号 cw0590)、两步法荧光定量试剂盒 (批号 cw0662):康为世纪生物有限公司。MethylampTM DNA Modification 试剂盒:美国 Epigentek。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。hTERT (5′ to 3′): F: AGGGGCAAGTC-CTACGTCCAGT, R: CACCAACAAGAAATCATC-CACC, 160bp。GAPDH (5′ to 3′): F: AGGTG-GTCTCCTCTGACTT, R: TTGCTGTAGCCAAAT-TCGTTGT, 150bp。hTERT MSP-UPU (5′ to 3′): F: GGGAGGTATTTTGGGAGGTTTGT, R: CAAACTC-CAAACACCACAAATACCA, 126bp。hTERTMSP-UPM (5′ to 3′): F: GAGGTATTTTCGGGAG-GTTTCGC, R: ACTCCGAACACCACGAATACCG, 121bp。

1.3 主要仪器和设备

高速低温离心机:美国 Thermo IEC 公司,MI-CROMAX RF 型。超低温冰箱:美国 Thermo Forma 公司,725 型。恒温振荡仪:太仓市实验设备厂,TH2-C 型。酶标仪:美国 Thermo 公司,MK3 型。恒温水浴锅:美国 Thermo 公司,NESLAB 型荧光定量 PCR 仪:美国 ABI 公司,7500MJ Mini。

1.4 造模方法

参考文献 [7] 方法,KG1a 细胞株常规培养于含 20% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中,培养在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中,1~2 天换液传代 1 次。小鼠经 ⁶⁰Co 照射后 24h 内,取对数生长期的 KG1a 细胞,重新悬浮于生理盐水中,调整浓度为 5×10⁶ 个/ml。在无菌操作台上,将小鼠放入固定器内,每只小鼠尾静脉注射对数生长期的 KG1a 细胞 1×10⁶ 个 (0.2 ml)。接种 KG1a 细胞 7 天后小鼠骨髓中即可见数量不等的 KG1a 细胞,约 2 周后外周血涂片就可见 KG1a 细胞,小鼠出现活动减少、精神萎靡、食欲不振、消瘦、髓外脏器浸润等

表现,说明照射后 NOD-SCID 小鼠接种 KG1a 细胞能真实再现人类急性白血病细胞累及骨髓,弥漫性全身浸润的特点。

1.5 动物分组及用药

取接种 1 周后 NOD-SCID 小鼠 40 只,采用随机数字表法分为模型组、扶正组、祛邪组、全方组,每组 10 只。模型组予生理盐水灌胃;扶正组予扶正方浓缩药液灌胃;祛邪组予祛邪方浓缩药液灌胃;全方组予益气养阴方浓缩药液灌胃。各组均 0.2 ml/次,每日 2 次,共 28 天。

1.6 观察指标及方法

小鼠骨髓细胞悬液制备:小鼠摘眼球取血后,置于 75% 酒精中浸泡 3 min,置于无菌纸上,应用无菌手术器械解剖,取出其胫骨及股骨,剪去所有肌肉,放入含 PBS 的无菌培养皿中;用无菌剪刀剪断胫骨及股骨两端,在培养皿中用 5 ml 空针抽吸 PBS 将骨髓反复冲洗直至骨头外观呈白色时将骨髓全部冲出;用 1 ml 空针头将含有骨髓的液体过滤至离心管中;1500 r/min 离心 3 min 后,弃液,制备骨髓细胞悬液。采用 PCR-ELISA 法检测骨髓细胞端粒酶活性,采用荧光定量 PCR 法检测骨髓细胞中 hTERT-mRNA 表达,采用 MSP 法修饰后,荧光定量 PCR 法检测 hTERT 启动子甲基化表达。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 18.0 统计软件,所有数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对所得数据进行单因素方差分析,方差不齐者,将数值取对数值后进行方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠骨髓细胞端粒酶活性、hTERT-mRNA 表达比较

表 1 示,扶正组、祛邪组和全方组小鼠骨髓细胞端粒酶活性和 hTERT-mRNA 表达较模型组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),全方组端粒酶活性和 hTERT-mRNA 表达低于扶正组与祛邪组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 各组小鼠 hTERT 启动子甲基化表达比较

表 2 示,扶正组、祛邪组和全方组 hTERT 启动子甲基化的表达较模型组降低,非甲基化表达明显升高 ($P < 0.05$)。全方组 hTERT 启动子甲基化的表达低于祛邪组和扶正组,非甲基化表达高于祛邪组和扶正组 ($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠骨髓细胞端粒酶活性、hTERT-mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	端粒酶活性	hTERT-mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
模型组	10	9.82 ± 3.04	1.89 ± 0.74
扶正组	10	7.60 ± 2.58 ^{*△}	0.89 ± 0.11 ^{**△△}
祛邪组	10	5.38 ± 2.21 ^{*△}	0.63 ± 0.22 ^{**△△}
全方组	10	2.56 ± 1.08 [*]	0.04 ± 0.01 ^{**}

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与全方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 各组小鼠 hTERT 启动子甲基化表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	甲基化表达	非甲基化表达
模型组	10	4.39 ± 3.86	1.56 ± 2.01
扶正组	10	0.95 ± 0.93 ^{*△}	4.01 ± 1.99 ^{*△}
祛邪组	10	0.91 ± 1.51 ^{*△}	14.79 ± 17.29 ^{*△}
全方组	10	0.12 ± 0.15 [*]	37.71 ± 25.11 [*]

注:与模型组比较, * $P < 0.05$; 与全方组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

白血病可归属于中医学“虚劳”、“温病”、“血证”、“癥瘕”等范畴。根据《黄帝内经》“邪之所凑,其气必虚”的理论,白血病的发生与体内正气不足、易感邪气有关。邪毒侵袭人体,耗伤气阴,又使正气更虚。其病机多为气阴两虚、气血双亏、毒热炽盛、瘀血痰结^[1],治疗上多采用扶正补虚、清热解毒、活血化瘀等方法。益气养阴方功效以益气养阴为主,兼顾清热解毒、凉血止血,从组方立法分析,其益气、养阴、补血类药物体现了中医扶正治法;其清热解毒、凉血止血类药物体现了中医祛邪治法;整个方剂体现了中医扶正与祛邪并用、攻补兼施的用法。方中重用太子参以补气生津,黄精滋阴益气,共同针对气阴两虚的本虚病机,使气旺津生,起到主要治疗作用。黄芪助太子参健脾益气,补诸虚之不足,使气旺而血生,黄精、麦冬养阴生津,使精血化生有源而填精益髓。半枝莲与白花蛇舌草合用契合热毒与瘀血互结的标实病机,有清热解毒、化瘀利水又兼具通络止痛之功。佐以生地黄清血热、填骨髓、养阴津;牡丹皮为血中之气药,行血中之瘀滞,而又清血中之郁热。墨旱莲、女贞子归肝肾经,在补肝肾之阴的前提下,又具备凉血止血之功,白术、茯苓一方面可

助君臣药健脾益气,而其性平、温,又可佐制大剂清热凉血解毒药的苦寒之性,顾护中州脾胃运化功能。

本研究结果显示,益气养阴方及其拆方治疗后,各用药组小鼠骨髓细胞端粒酶活性、hTERT-mRNA 的表达及其启动子甲基化的表达较模型组降低,并且全方组端粒酶活性、hTERT-mRNA 的表达及其启动子甲基化的表达低于扶正组与祛邪组。表明益气养阴方可使小鼠骨髓细胞端粒酶活性明显降低, hTERT-mRNA 及其启动子甲基化的表达明显减少,推测益气养阴方通过减少 hTERT 启动子甲基化,抑制 hTERT-mRNA 的表达,降低端粒酶活性,达到治疗白血病的目的。

本研究从分子生物学及表观遗传学层面,初步揭示益气养阴方治疗白血病的可能作用机理,为中医药参与白血病的防治提供理论依据。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。

参考文献

[1] 徐瑞荣,顾振东,焦中华,等. 益气养阴清热法化疗治疗急性髓细胞白血病 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2003, 13(9): 539-540.

[2] 李守娟,顾健. DNA 拓扑异构酶和端粒酶与白血病耐药关系 [J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(1): 207-210.

[3] Klingelhutz AJ. Telomerase activation and cancer [J]. J Mol Med, 1997, 75(1): 45-49.

[4] Chang JT, Chen YL, Yang HT, et al. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits [J]. Eur J Biochem, 2002, 269(14): 3442-3450.

[5] Guilleret I, Yan P, Grange F, et al. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity [J]. Int J Cancer, 2002, 101(4): 335-341.

[6] Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, et al. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers [J]. Cancer Sci, 2008, 99(8): 1528-1538.

[7] 解启莲,甄素芬,李丽红. 人急性早幼粒细胞白血病 SCID 小鼠模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(4): 203-205.

Effects of *Yiqi Yangyin Formula* and Its Disassembled Prescriptions on Methylation and Expression of hTERT and Its Promoter in Bone Marrow Cells of Mice with Acute Myeloid Leukemia

XU Ruirong¹, JIAO Ning², CHEN Chong³, WANG Yan¹, LUO Yaqin¹

(1. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong Province 250014; 2. TCM Hospital of Zibo City, Shandong Province; 3. The Clinical Medicine School of Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To research the possible mechanism of *Yiqi Yangyin Formula* (Qi-Boosting Yin-Nourishing Formula) for acute myeloid leukemia (AML) . **Methods** Forty nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice were irradiated with ⁶⁰Co and induced into AML models with tail vein injection of 1×10^6 KG1a cells. The models were randomized into four groups with 10 in each. The model group was gavaged with normal saline. The vital qi-supporting group was gavaged with 1.08 g/ml concentrated solution of vital qi-supporting formula. The evil-dispelling group was gavaged with 0.92 g/ml concentrated solution of evil-dispelling formula. The entire formula group was gavaged with 2 g/ml concentrated solution of entire formula. Each group was gavaged with 0.2 ml solution/each time, twice daily for 28 days. The telomerase activity in bone marrow cells was detected with PCR-ELISA method. The methylation and expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and its promoter were detected with quantitative PCR. **Results** Comparing with the model group, the activity of hTERT and the methylation and expression of hTERT mRNA and its promoter was significantly decreased in the vital qi-supporting group, evil-dispelling group and entire formula group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), especially in the entire formula group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) . **Conclusion** *Yiqi Yangyin Formula* can treat AML by reducing the activity of hTERT and the methylation and expression of hTERT mRNA and its promoter.

Keywords *Yiqi Yangyin Formula* (Qi-Boosting Yin-Nourishing Formula) ; acute myeloid leukemia; human telomerase reverse transcriptase; methylation

(收稿日期: 2013-06-14; 修回日期: 2013-10-07)

编辑: 邓 媛

欢迎订阅 2014 年 《中医杂志》

《中医杂志》是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主，兼顾普及”的办刊方针，是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一，是中国中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊。2009 年被中国期刊协会评为“新中国 60 年有影响力的期刊”。2011 年获国家新闻出版政府奖期刊奖提名奖，并且是唯一获此荣誉的中医类期刊。2013 年被国家新闻出版总署评为“中国百强科技期刊”。

本刊主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验；临床研究、临床报道介绍中医药治疗的新方法、新成果。学术探讨、思路与方法、专家论坛、病例讨论、综述、百家园等栏目，提供最新信息与治疗方法，成为学习中医药、研究中医药，不断提高临床及研究水平的良师益友。2014 年《中医杂志》将从内容、版式、纸张多方面进行调整以更好地满足读者的需要。

《中医杂志》为半月刊，2014 年将改为国际标准大 16 开本，每月 2 日和 17 日出版，每期 15.00 元。读者可以到全国各地邮局办理订阅手续（邮发代号：2-698），也可以与本刊读者服务部联系邮购，邮购免邮费。电话：010-64035632。国外发行：中国国际图书贸易总公司（北京 399 信箱，邮编：100044，代号：M140）。本社地址：北京市东直门内南小街 16 号，邮编：100700，网址：<http://www.jtcm.net.cn>。