

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.05.015

升麻鳖甲汤加减方对人急性髓系白血病 HL-60 细胞增殖、凋亡及 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

代会博, 马邦云, 张弘, 王梦亚, 孙雪梅*

南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市秦淮区汉中路 155 号, 210029

摘要 目的 探讨升麻鳖甲汤加减方治疗急性髓系白血病的可能机制。方法 采用 MTT 法观察 0、2、4、6、8、10 mg/ml 浓度的升麻鳖甲汤加减方干预 HL-60 细胞 24 h、48 h、72 h 时细胞增殖抑制率, 筛选最佳实验时间和药物浓度。取对数生长期 HL-60 细胞 5×10^5 个/ml, 按每孔 2 ml 体积种入 6 孔培养板中。分别加入筛选浓度的升麻鳖甲汤加减方设为升麻鳖甲汤加减方低、中、高剂量组, 另设对照组加入等体积完全培养基, 继续培养筛选得出的最佳实验时间后收集各组细胞。采用 Hoechst 33258 染色、流式细胞术观察各组细胞凋亡率, 检测细胞周期分布、线粒体膜电位及细胞凋亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 (caspase-8)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9 (caspase-9)、多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (PARP) 表达, MAPK 信号通路相关蛋白 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK)、细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 蛋白表达。结果 筛选得出 24 h 为最佳作用时间, 升麻鳖甲汤加减方高、中、低剂量组干预浓度分别为 4、6、8 mg/ml。升麻鳖甲汤加减方各剂量组均不同程度抑制人急性髓系白血病细胞 HL-60 增殖 ($P < 0.05$); Hoechst 33258 染色和 Annexin V/PI 检测结果均显示, 升麻鳖甲汤加减方各剂量组可呈浓度依赖性的增加细胞凋亡率, 同时升高线粒体膜电位 ($P < 0.05$); 升麻鳖甲汤加减方各剂量组可呈浓度依赖性阻滞细胞周期升高凋亡相关蛋白表达以及 MAPK 信号通路相关蛋白水平 ($P < 0.05$)。结论 升麻鳖甲汤加减方可通过阻滞 HL-60 细胞细胞周期、诱导其线粒体膜电位的丢失引发细胞凋亡, 从而抑制其增殖, 可能与调控 MAPK 信号通路有关。

关键词 升麻鳖甲汤加减方; 急性髓系白血病; HL-60 细胞; 细胞凋亡; 细胞周期; 线粒体膜电位; MAPK 信号通路

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一类起源于造血干细胞的血液系统恶性肿瘤, 以骨髓、外周血、组织中大量髓系来源的原始细胞克隆性增殖和浸润, 并对机体正常造血机能造成破坏为基本特征, 严重威胁人类健康^[1-3]。迄今为止, 包括联合化疗、靶向治疗、造血干细胞移植等在内的多重方法治疗 AML 疗效并不理想^[4]。中医药是我国宝贵的医疗资源, 在白血病的临床治疗中也有其独到之处^[5-6]。我们前期基于 AML 患者温热毒邪蕴伏骨髓的关键病机, 拟升麻鳖甲汤加减方配合化疗治疗老年 AML, 可明显提高患者的缓解率^[7]。本研究拟通过体外实验探讨升麻鳖甲汤加减方对 AML 细胞 HL-60 的增殖、凋亡以及相

关蛋白、MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响, 探讨该复方的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

人急性髓系白血病细胞系 HL-60 细胞由南京中医药大学附属医院中心实验室惠赠。常规方法复苏冻存于液氮中的 HL-60 细胞, 以含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基置于 37℃、5% CO₂ 的细胞孵育箱内进行培养, 每日观察细胞生长状态, 待细胞进入对数生长期后进行后续实验。

1.2 药物

升麻鳖甲汤加减方组成: 升麻 15 g, 醋鳖甲 30 g, 通关藤 15 g, 青黛 6 g, 当归 9 g, 甘草 3 g, 购自南京中医药大学附属医院中药房。取组方药物 78 g 以捣碎机捣碎并混匀, 再用 10 L 双蒸水将其浸

基金项目: 国家自然科学基金 (8157140609)

* 通讯作者: sunxuemei2018@126.com

泡 2 h, 然后煎煮 1 h。冷却后的药液以双层纱布进行过滤, 将 3 次循环得到的滤液混合, 过滤后的溶液在真空蒸发器中浓缩成残渣, 然后蒸馏成液体。最终水提液的生药浓度为 1.0 g/ml, 储存于 4℃ 冰箱备用。

1.3 主要试剂及仪器

RPMT-1640 培养基 (货号: 21870076)、胎牛血清 (FBS, 货号: A3160901) 购自美国 Gibco 公司; Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒 (货号: KGA105)、细胞周期检测试剂盒 (货号: KGA512)、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒 (货号: KGA602) 均购自南京凯基生物技术有限公司; RIPA 裂解液 (货号: P0013C)、BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: P0012)、噻唑蓝 (MTT, 货号: ST316)、二甲基亚砜 (DMSO, 货号: ST038)、Heocheest 33258 染色试剂盒 (货号: C0003)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (货号: P0012A) 均购自碧云天生物技术有限公司; PVDF 膜 (货号: R9DA19786)、ECL 化学发光液 (货号: 1730501) 均购自美国 Millipore 公司; 兔抗人多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (PARP, 货号: 9532T)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3, 货号: 9662S)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 (caspase-8, 货号: 4790T)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9 (caspase-9, 货号: 9508T)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK, 货号: 8590T) 及其磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38 MAPK, 货号: 4511T)、细胞外信号调节激酶 (ERK, 货号: 4695S) 及其磷酸化蛋白 (p-ERK, 货号: 8544S)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK, 货号: 9252S) 及其磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK, 货号: 4668T) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 鼠抗人 β -actin 抗体 (货号: ab8226) 购自美国 Abcam 公司; 兔抗人 GAPDH 抗体 (货号: e-AB-20059) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 抗鼠 IgG 二抗 (货号: ZB-2305) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

CO₂ 培养箱 (型号: HeraCell 150i)、微波震荡仪 (型号: 4625-1 CEM)、冷冻高速离心机 (型号: Fresco 21) 均为 Thermo 公司产品; 倒置显微镜 (Olympus 公司, 型号: CKX41); 台式多用离心机 (北京自洋医疗器械有限公司, 型号: 320A); 流式细胞仪 (美国 BD 公司, 型号: Accuri C6); 酶标仪 (Biotek Instruments 公司, 型

号: ELX800)。

1.4 升麻鳖甲汤加减方药物浓度及最佳实验时间筛选

取对数生长期 HL-60 细胞, 计数并调整细胞密度至 5×10^5 个/ml, 按每孔 100 μ l 体积种入 96 孔细胞培养板。随后将升麻鳖甲汤加减方进行梯度稀释, 每孔 10 μ l 加入细胞培养体系之中, 使其终浓度分别为 0、2、4、6、8、10 mg/ml, 每个浓度设 6 个复孔, 分别培养 24、48、72 h。随后每孔中加入 20 μ l MTT 溶液, 置于 CO₂ 培养箱中避光孵育 4 h 后, 室温下 1500 r/min (半径 11.53 cm) 离心 20 min, 弃去细胞培养基, 每孔中加入 150 μ l DM-SO, 微型振荡仪上避光振荡 10 min 后以酶标仪计在 490 nm 处各孔的吸光度值 (OD)。按公式计算细胞增殖抑制率, 细胞增殖抑制率 (%) = (阴性对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 阴性对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.5 细胞分组及干预方法

取对数生长期 HL-60 细胞, 计数并调整细胞密度至 5×10^5 个/ml, 按每孔 2 ml 体积种入 6 孔培养板中。实验分别加入筛选出的高、中、低浓度的升麻鳖甲汤加减方水提液设为高、中、低剂量组, 最后每孔以完全培养基补足 2 ml。另设对照组加入等体积完全培养基, 继续培养筛选得出的最佳实验时间后收集各组细胞。每次实验重复 3 次。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 流式细胞术检测细胞周期 按细胞周期检测试剂盒说明书进行操作, 以 PBS 清洗 2 次, 固定于 75% 乙醇中, -20℃ 冰箱中放置过夜。弃去固定液, PBS 清洗 1 次并重悬于 2 ml PBS 中, 分别加入细胞凋亡试剂盒中浓度为 1 mg/ml 的碘化丙啶 (PI) 5 μ l 和浓度为 1 mg/ml 的 RNase A 1 μ l, 避光孵育 30 min 后, 在流式细胞仪上进行检测。

1.6.2 Heocheest 33258 法检测细胞凋亡情况 以 4% 多聚甲醛固定 30 min 后去除固定液, PBS 洗涤 1 次, 将细胞滴加在载玻片上自然风干, 滴加浓度为 500 ng/ml 的 Heocheest 33258 染色剂 0.5 ml, 染色 5 min, 室温孵育 30 min 后以 PBS 洗涤 1 次, 待自然晾干后, 滴加抗荧光淬灭封片, 于倒置显微镜下观察被染成蓝色的细胞核形态, 细胞核形态致密浓染的为凋亡细胞。细胞凋亡率 (%) = 凋亡细胞数 / 总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6.3 流式细胞术检测细胞凋亡情况 按照 Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒步骤操作, 用 PBS 洗

涂 2 次, 随后以 400 μl 的 $1 \times \text{Binding}$ 缓冲液将细胞重悬固定, 加入 3 μl Annexin V-FITC 避光孵育 15 min, 再加入 3 μl PI 进行染色, 最后上流式细胞仪进行检测。

1.6.4 流式细胞术检测线粒体膜电位 收集细胞, PBS 洗涤, 加入线粒体膜电位检测试剂盒中体积 1 ml 的 Staining 缓冲液重悬细胞, 从对照组中分出一半细胞, 在其中加入线粒体膜电位检测试剂盒中 1 μl CCCP (终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$) 作为阳性参照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。随后, 每管细胞中再加入 1 μl 的 JC-1, 在 CO_2 培养箱中孵育 20 min。孵育完成后弃去上清, 用 PBS 洗去多余染料, 在流式细胞仪上进行检测。

1.6.5 Western blot 法检测凋亡相关蛋白及 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平 凋亡相关蛋白包括 PARP、caspase-3、caspase-8、caspase-9, 结果用其剪切体与各蛋白的比值表示, 即 cleaved PARP/PARP、cleaved caspase-3/caspase-3、cleaved caspase-8/caspase-8、cleaved caspase-9/caspase-9; MAPK 信号通路相关蛋白包括 p38 MAPK、ERK、JNK, 结果用其磷酸化蛋白与各蛋白比值表示, 即 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK。收集各组 HL-60 细胞, PBS 洗涤 2 次后加入 RIPA 裂解液裂解细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 g/min 离心 20 min 后取上清, 用 BCA 法检测蛋白浓度。将余下的上清液煮沸变性, 并取 30 μg 蛋白样品上样, 用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 3 h, 再分别加入一定稀释比例的抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 用 TBST 洗膜 4 次, 每次 15 min, 随后放入相应的二抗中室温下孵育 1 h, 最后用 ECL 化学发光试剂显影曝光。实验以 β -actin 或 GAPDH 为内参, 用 Image Lab 5.1.0 软件进行统计分析 Western blot 条带。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 计量数据符合正态分布采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,

组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验药物浓度及最佳实验时间筛选结果

在给药 24、48、72 h 后, 利用 SPSS 22.0 建立给药浓度与细胞增殖抑制率的概率单位回归方程, 得出升麻鳖甲汤加减方 24、48、72 h 时细胞半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 6.95、3.76、2.21 mg/ml。表 1 示, 与浓度为 0 mg/ml 同时间点比较, 2、4、6、8、10 mg/ml 升麻鳖甲汤加减方作用于 HL-60 细胞后, 24、48、72 h 细胞增殖抑制率差异均有统计学意义, 并且随着时间的延长细胞增殖抑制率亦升高 ($P < 0.05$)。与同时间上一浓度比较, 细胞增殖抑制率在 24、48 h 时 4、6、8 mg/ml 浓度之间比较差异有统计学意义, 在 72 h 时浓度为 4 mg/ml 时细胞增殖抑制率明显高于浓度为 2 mg/ml ($P < 0.05$)。后续实验中, 考虑到随着时间的延长, 培养基营养成分的消耗可能在一定程度上影响实验结果, 故我们选择 24 h 为作用时间, 升麻鳖甲汤加减方浓度选择 IC_{50} 值附近及前后的各一个浓度为低、中、高浓度, 即 4、6、8 mg/ml。

表 1 不同浓度升麻鳖甲汤加减方干预 HL-60 细胞不同时间后细胞增殖抑制率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

浓度 (mg/ml)	样本数	24 h	48 h	72 h
0	6	0	0	0
2	6	-9.47 $\pm$ 2.73*	22.3 $\pm$ 5.65* Δ	44.83 $\pm$ 2.33* Δ $\blacktriangle$
4	6	16.63 $\pm$ 3.47* $\#$	58.47 $\pm$ 5.05* Δ $\#$	72.47 $\pm$ 7.56* Δ $\blacktriangle$ $\#$
6	6	46.53 $\pm$ 6.18* $\#$	69.03 $\pm$ 4.84* Δ $\#$	77.93 $\pm$ 4.55* Δ $\blacktriangle$ $\#$
8	6	61.43 $\pm$ 9.01* $\#$	78.27 $\pm$ 3.50* Δ $\#$	84.07 $\pm$ 3.19* Δ $\blacktriangle$ $\#$
10	6	66.57 $\pm$ 6.20*	80.77 $\pm$ 4.97* Δ	86.97 $\pm$ 2.96* Δ $\blacktriangle$

注: 与 0 mg/ml 同时间点比较, * $P < 0.05$; 与同浓度 24 h 比较, $\Delta P < 0.05$; 与同浓度 48 h 比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与同时间上一浓度比较, $\#P < 0.05$

2.2 各组 HL-60 细胞细胞周期比较

表 2 示, 与对照组比较, 升麻鳖甲汤加减方各剂量组 G1 期减少, S 期增加 ($P < 0.05$), 升麻鳖甲

表 2 各组 HL-60 细胞细胞周期分布比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	G1 期	S 期	G2/M 期
对照组	3	24.52 $\pm$ 0.46	41.80 $\pm$ 1.19	33.68 $\pm$ 1.16
升麻鳖甲汤加减方低剂量组	3	22.76 $\pm$ 0.32*	46.23 $\pm$ 1.30*	31.00 $\pm$ 1.00
升麻鳖甲汤加减方中剂量组	3	20.58 $\pm$ 1.12* Δ	54.93 $\pm$ 1.42* Δ	24.49 $\pm$ 1.89* Δ
升麻鳖甲汤加减方高剂量组	3	19.54 $\pm$ 0.53* Δ $\blacktriangle$	63.97 $\pm$ 1.03* Δ $\blacktriangle$	16.49 $\pm$ 1.47* Δ $\blacktriangle$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与升麻鳖甲汤加减方低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与升麻鳖甲汤加减方中剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

汤加减方中、高剂量组 G2/M 期减少 ($P < 0.05$)。与升麻鳖甲汤加减方低剂量组比较, 升麻鳖甲汤加减方中、高剂量组 S 期增加, G1 期和 G2/M 期减少 ($P < 0.05$)。与升麻鳖甲汤加减方中剂量组比较, 升麻鳖甲汤加减方高剂量组 S 期增加, G1 期和 G2/M 期减少 ($P < 0.05$)。

2.3 各组 HL-60 细胞凋亡率及线粒体膜电位比较

表 3 示, Heochest 33258 染色和 Annexin V/PI 检测结果均显示, 升麻鳖甲汤加减方各剂量组可呈浓度依赖性的增加细胞凋亡率 ($P < 0.05$); 线粒体膜电位逐渐升高, 亦呈现出浓度依赖性 ($P < 0.05$)。

2.4 各组 HL-60 细胞凋亡相关蛋白表达比较

表 4 示, 与对照组比较, 升麻鳖甲汤加减方各剂量组 cleaved PARP/PARP、cleaved caspase-3/caspase-3、cleaved caspase-8/caspase-8、cleaved

caspase-9/caspase-9 值均增加 ($P < 0.05$)。与升麻鳖甲汤加减方低剂量组比较, 升麻鳖甲汤加减方中、高剂量组各比值均增加 ($P < 0.05$)。与升麻鳖甲汤加减方中剂量组比较, 升麻鳖甲汤加减方高剂量组 cleaved caspase-3/caspase-3 值升高, cleaved caspase-9/caspase-9 值降低 ($P < 0.05$)。

2.5 各组 HL-60 细胞 MAPK 信号通路相关蛋白表达比较

表 5 示, 与对照组比较, 升麻鳖甲汤加减方各剂量组 p-p38MAPK/p38MAPK、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 值均增加 ($P < 0.05$)。与升麻鳖甲汤加减方低剂量组比较, 升麻鳖甲汤加减方中、高剂量组 p-p38MAPK/p38MAPK 值增加, 升麻鳖甲汤加减方高剂量组 p-JNK/JNK 值亦增加 ($P < 0.05$)。与升麻鳖甲汤加减方中剂量组比较, 升麻鳖甲汤加减方高剂量组 p-p38MAPK/p38MAPK 值增加 ($P < 0.05$)。

表 3 各组 HL-60 细胞凋亡率及线粒体膜电位比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞凋亡率 (%)		线粒体膜电位
		Heochest 33258 染色	Annexin V/PI 检测	
对照组	3	2.36 ± 0.06	2.57 ± 0.09	0.15 ± 0.02
升麻鳖甲汤加减方低剂量组	3	11.00 ± 2.21*	13.63 ± 0.29*	1.15 ± 0.04*
升麻鳖甲汤加减方中剂量组	3	30.48 ± 0.78*△	27.40 ± 0.65*△	2.81 ± 0.06*△
升麻鳖甲汤加减方高剂量组	3	48.03 ± 4.94*△▲	36.30 ± 1.07*△▲	3.56 ± 0.36*△▲

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与升麻鳖甲汤加减方低剂量组比较, △ $P < 0.05$; 与升麻鳖甲汤加减方中剂量组比较, ▲ $P < 0.05$

表 4 各组 HL-60 细胞凋亡相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	cleaved caspase-3/ caspase-3	cleaved caspase-8/ caspase-8	cleaved caspase-9/ caspase-9	cleaved PARP/ PARP
对照组	3	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.06
升麻鳖甲汤加减方低剂量组	3	6.55 ± 0.81*	1.97 ± 0.27*	2.05 ± 0.13*	5.47 ± 1.22*
升麻鳖甲汤加减方中剂量组	3	17.11 ± 1.78*△	9.94 ± 0.92*△	3.23 ± 0.07*△	8.81 ± 1.58*△
升麻鳖甲汤加减方高剂量组	3	25.54 ± 3.43*△▲	10.01 ± 1.75*△	2.98 ± 0.04*△▲	9.07 ± 1.44*△

注: caspase-3, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; cleaved caspase-3, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 剪切体; caspase-8, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8; cleaved caspase-8, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 剪切体; caspase-9, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9; cleaved caspase-9, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9 剪切体; PARP, 多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶; cleaved PARP, 多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶剪切体; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与升麻鳖甲汤加减方低剂量组比较, △ $P < 0.05$; 与升麻鳖甲汤加减方中剂量组比较, ▲ $P < 0.05$

表 5 各组 HL-60 细胞 MAPK 信号通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	p-p38MAPK/p38MAPK	p-ERK/ERK	p-JNK/JNK
对照组	3	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.14
升麻鳖甲汤加减方低剂量组	3	7.69 ± 0.79*	10.40 ± 1.67*	6.97 ± 0.62*
升麻鳖甲汤加减方中剂量组	3	10.61 ± 1.04*△	11.75 ± 1.40*	8.27 ± 0.98*
升麻鳖甲汤加减方高剂量组	3	14.54 ± 0.93*△▲	10.72 ± 2.05*	10.98 ± 1.38*△

注: p38 MAPK, p38 丝裂原活化蛋白激酶; p-p38 MAPK, 磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶; ERK, 细胞外信号调节激酶; p-ERK, 磷酸化细胞外信号调节激酶; JNK, c-Jun 氨基末端激酶; p-JNK, 磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与升麻鳖甲汤加减方低剂量组比较, △ $P < 0.05$; 与升麻鳖甲汤加减方中剂量组比较, ▲ $P < 0.05$

3 讨论

现代医家将急性髓系白血病称为“急髓毒病”^[8]。首批国家级名老中医、南京中医药大学周仲瑛教授根据历代医家的相关理论,结合个人多年临床经验,针对恶性肿瘤提出“伏毒”学说^[9]。“伏毒”是指毒邪潜伏人体,伺机而发的病理特质,其具有蛰伏、缠绵、暗耗、难治等特点^[10],此与 AML 的缓解率低、复发率高、预后极差等特点相一致。“伏毒”由里而外蒸发,热结、耗血、动血、瘀停并存,出现高热、斑疹、出血、舌质红绛等证候。治疗当以透发毒邪为先,兼顾凉血、散血、养阴。因此,自拟升麻鳖甲汤加减方用于 AML 的治疗。方中君以升麻入阳明、太阴二经,其性辛、甘、微寒,能解百毒;臣以鳖甲养阴清热,可“去血气,破癥积、恶血”(《日华子本草》)。当归辛行温通,能通络中之血,与鳖甲相合,可增强养阴血、通血脉之功,是为佐药。当归性虽辛温,但在方中起到相成作用,是为反佐。升麻鳖甲汤原方中雄黄、蜀椒辛温有毒,能消散瘀血,尚有以毒攻毒、因势利导作用。但我们认为,蜀椒、雄黄为辛烈之品,有劫阴伤正、加重发热、甚至诱发出血等弊端,故临床多避用,以遵吴鞠通“邪气深伏血分,混处血络之中,不能纯用养阴,又非壮火,更不得任用枯燥”之旨^[11]。通关藤具有止咳平喘、清热解毒的功效。有研究^[12]显示,通关藤制剂消癌平注射液联合化疗治疗初发非 M3 型 AML,可显著提高初治患者的诱导缓解率。青黛其性寒味咸,有清热解毒、凉血消斑、泻火定惊等功效。前期研究中,我们发现青黛有效成分在体外对 HEL 细胞具有显著的抑制增殖作用,且可诱导细胞早期凋亡和单核系分化^[13]。甘草为使,既清热解毒,又调和诸药。

恶性细胞失控性增殖是 AML 以及其他各系统恶性肿瘤的特点之一,而这一特点的产生是以细胞周期调控紊乱为基础的^[14-15]。本研究结果显示,与对照组比较,升麻鳖甲汤加减方各剂量组均在不同程度上阻滞 HL-60 细胞于 S 期,抑制其增殖。除了失控性增殖,细胞凋亡机制失控也是 AML 等恶性肿瘤的另一重要特征^[16]。作为早期被发现和认可的肿瘤细胞死亡形式,细胞的凋亡一般经历了凋亡信号传递和接收、促凋亡与抑凋亡相关分子的相互作用、caspase 家族分子活化以及凋亡级联反应^[17]。线粒体膜电位丢失是细胞凋亡起始阶段的

重大事件,也是细胞凋亡进程中的必然事件,当细胞受到药物或其他因素刺激,线粒体膜结构改变导致通透性增加,此后伴随线粒体膜电位的丢失^[18-19]。在本次实验中,Heochest 33258 染色结果与 Annexin V/PI 流式检测结果共同显示,升麻鳖甲汤加减方各剂量组均可诱导 HL-60 细胞凋亡,并且随着药物浓度的升高,细胞凋亡率逐渐升高。因此,升麻鳖甲汤加减方各剂量组亦可导致 HL-60 细胞线粒体膜电位的丢失和下移,并且下移的程度与药物的浓度存在正相关。Western blot 实验结果显示,升麻鳖甲汤加减方各剂量组可显著增加凋亡相关蛋白 PARP、caspase-3、caspase-8、caspase-9 的表达。

MAPK 通路是一类经典信号通路,在多种肿瘤性疾病的发生发展中起着重要作用,MAPK 信号通路级联包括三个蛋白激酶核心,分别是 ERK、p38 和 JNK^[20-21]。相关文献报道称,MAPK 家族成员可被多种化合物诱导活化,并参与到肿瘤细胞的细胞周期阻滞和凋亡诱导的调控进程之中^[22-23]。在本研究中,我们观察了 HL-60 细胞经升麻鳖甲汤加减方各剂量组干预后可显著增加 MAPK 通路核心分子 p38 MAPK、ERK 以及 JNK 的蛋白表达,并且表现出较为明显浓度依赖性,提示 MAPK 可能参与了升麻鳖甲汤加减方诱导 HL-60 细胞凋亡和周期阻滞进程的调控。

综上所述,本研究初步证实了升麻鳖甲汤加减方可通过阻滞细胞周期、诱导其线粒体膜电位的丢失、引发细胞凋亡从而抑制其增殖,在此过程中可能涉及了 MAPK 信号通路的激活和调控。在后续的研究中我们将开展体内实验,以进一步验证该复方的作用,并深入探究其起效的分子学机制。

参考文献

- [1] LIM SH, DUBIELECKA PM, RAGHUNATHAN VM. Molecular targeting in acute myeloid leukemia [J]. J Transl Med, 2017, 15(1): 183.
- [2] SAYGIN C, CARRAWAY HE. Emerging therapies for acute myeloid leukemia [J]. J Hematol Oncol, 2017, 10(1): 93.
- [3] MOLICA M, BRECCIA M, FOA R, et al. Maintenance therapy in AML: the past, the present and the future [J]. Am J Hematol, 2019, 94(11): 1254-1265.
- [4] FERRARA F, LESSI F, VITAGLIANO O, et al. Current therapeutic results and treatment options for older patients with relapsed acute myeloid leukemia [J]. Cancers

- (Basel), 2019, 11(2): E224.
- [5] FLEISCHER T, CHANG TT, CHIANG JH, et al. Improved survival with integration of Chinese herbal medicine therapy in patients with acute myeloid leukemia: a nationwide population-based cohort study [J]. Integr Cancer Ther, 2017, 16(2): 156-164.
 - [6] HUANG L, LI H, XIE D, et al. Personalizing Chinese medicine by integrating molecular features of diseases and herb ingredient information: application to acute myeloid leukemia [J]. Oncotarget, 2017, 8(26): 43579-43591.
 - [7] 代兴斌, 孙雪梅, 姜鹏君, 等. 升麻鳖甲汤加减方联合 CAG 方案治疗阴虚毒瘀型老年急性髓系白血病的临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2): 149-154.
 - [8] 蓝海, 侯丽, 郎海燕, 等. 常见血液病的中医分类与命名 [J]. 中医杂志, 2019, 60(9): 750-753, 778.
 - [9] 叶吉晃. 周仲瑛教授“伏毒”学说初探 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2006, 4(10): 4-7.
 - [10] 叶吉晃, 周仲瑛. 周仲瑛教授的“伏毒”学说 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2005, 3(12): 36.
 - [11] 代兴斌, 孙雪梅. 基于“伏毒”理论探讨应用升麻鳖甲汤治疗急性白血病 [J]. 江苏中医药, 2015, 47(2): 7-8.
 - [12] 佟丽, 董军杰, 王茂生, 等. 消癌平注射液联合化疗治疗初发非 M3 型急性髓细胞白血病 60 例临床观察 [J]. 河北中医, 2015, 37(1): 95-97.
 - [13] 姜鹏君, 孙雪梅, 陈敏, 等. 青黛提取物对 HEL 细胞增殖、凋亡和分化的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(3): 190-193.
 - [14] 詹启敏, 陈杰. 细胞周期与肿瘤转化医学 [J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(1): 1-7.
 - [15] 陈兆勋, 高彦宇, 李冀. 不同浓度槲皮素对人肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 细胞凋亡的影响 [J]. 中医杂志, 2015, 56(12): 1051-1053.
 - [16] MCBRIDE A, HOUTMANN S, WILDE L, et al. The role of inhibition of apoptosis in acute leukemias and myelodysplastic syndrome [J]. Front Oncol, 2019, 9: 192. doi: 10.3389/fonc.2019.00192.
 - [17] TAY KC, TAN LT, CHAN CK, et al. Formononetin: a review of its anticancer potentials and mechanisms [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 820. doi: 10.3389/fphar.2019.00820.
 - [18] FORBES-HERNÁNDEZ TY, GIAMPIERI F, GASPARRINI M, et al. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: a focus on apoptotic mechanisms [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 68: 154-82. doi: 10.1016/j.fct.2014.03.017.
 - [19] LIU J, ZHANG Y, CHEN L, et al. Polyphyllin I induces G2/M phase arrest and apoptosis in U251 human glioma cells via mitochondrial dysfunction and the JNK signaling pathway [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(6): 479-486.
 - [20] SUN Y, LIU WZ, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35(6): 600-604.
 - [21] SUI X, KONG N, YE L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents [J]. Cancer Lett, 2014, 344(2): 174-179.
 - [22] XU X, WANG J, ZHANG H, et al. Puerarin reduces apoptosis in rat hippocampal neurons cultured in high glucose medium by modulating the p38 mitogen activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways [J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(1): 78-84.
 - [23] CHAE HS, XU R, WON JY, et al. Molecular targets of genistein and its related flavonoids to exert anticancer effects [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10): E2420.

Effects of Modified Shengma Biejia Decoction (升麻鳖甲汤加减方) on Proliferation, Apoptosis and Expression of MAPK Signal Pathway Related Proteins in Human Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells

DAI Huibo, MA Bangyun, ZHANG Hong, WANG Mengya, SUN Xuemei

Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Modified Shengma Biejia Decoction* (升麻鳖甲汤加减方) in treating acute myeloid leukemia. **Methods** The MTT method was used to observe the effects of 0, 2, 4, 6, 8, and 10 mg/ml of *Modified Shengma Biejia Decoction* on the inhibition rate of cell proliferation of HL-60 cells at 24 h, 48 h, and 72 h. Take 5×10^5 /ml HL-60 cells in logarithmic growth phase and put into 6-well culture plates at a volume of 2 ml per well. Add the screened concentration of *Modified Shengma Biejia Decoction* of the high, medium, and low dose groups, and make the control group to add the same volume of complete medium. After continuing to screen the best experimental time, cells of each group were collected. Hoechst 33258 staining and flow cytometry were used to observe the apoptosis rate of each group. Cell cycle distribution, mitochondrial membrane potential, and

apoptosis-related proteins cysteine aspartase 3 (caspase-3), cysteine caspase-8 (caspase-8), cysteine caspase-9 (caspase-9), polyphosphate adenosine ribose polymerase (PARP) expression, MAPK signaling pathway-related protein p38 Mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), and c-Jun amino-terminal kinase (JNK) protein expression were detected. **Results** The optimal effect time was 24 h after screening. The intervention concentrations of the low, medium and high dose groups of *Modified Shengma Biejia Decoction* were 4, 6, and 8 mg/ml, respectively. The different dosage groups of *Modified Shengma Biejia Decoction* can inhibit the proliferation of HL-60 in human acute myeloid leukemia cells to varying degrees ($P < 0.05$). The results of Hoechst 33258 staining and Annexin V / PI showed that all dose groups of *Modified Shengma Biejia Decoction* can increase the apoptosis rate and increase the mitochondrial membrane potential in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$); the different dosage groups of *Modified Shengma Biejia Decoction* inhibit the expression of apoptosis-related proteins and the levels of MAPK signaling pathway-related proteins in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** The *Modified Shengma Biejia Decoction* can inhibit the proliferation of HL-60 cells by blocking the cell cycle, inducing the loss of mitochondrial membrane potential, and inducing apoptosis, which may be related to the regulation of MAPK signaling pathway.

Keywords *Modified Shengma Biejia Decoction* (升麻鳖甲汤加减方); acute myeloid leukemia; HL-60 cells; apoptosis; cell cycle; mitochondrial membrane potential; MAPK signal pathway

(收稿日期: 2019-05-10; 修回日期: 2019-09-16)

编辑: 邓 媛