

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.14.012

升麻鳖甲汤对急性髓系白血病模型小鼠骨髓线粒体分裂及自噬相关蛋白表达的影响

司雨平¹, 崔思远^{2,3}✉, 魏文健¹, 殷学伟¹, 李宗宏¹, 马国栋¹,
王琰², 郑伟², 王振振², 刘月莉², 王敬毅², 徐瑞荣²

1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东省济南市历下区经十路16369号, 250014; 2. 山东中医药大学附属医院; 3. 山东大学临床医学院

[摘要] **目的** 探讨升麻鳖甲汤治疗急性髓系白血病(AML)的可能作用机制。**方法** 48只NSG免疫缺陷小鼠随机分为空白组、模型组、升麻鳖甲汤全方组、升麻鳖甲汤拆方组, 每组12只。除空白组外, 其余各组小鼠采用小动物辐照仪予200 cGy ⁶⁰Co全身照射后, 尾静脉注射对数生长期的KG-1a细胞 1×10^6 个(0.2 ml), 建立AML小鼠模型。1周后模型组和空白组小鼠予生理盐水每次0.1 ml灌胃, 升麻鳖甲汤全方组小鼠予浓度为1.73 g/ml的升麻鳖甲汤药液每次0.1 ml灌胃, 升麻鳖甲汤拆方组小鼠予浓度为1.43 g/ml的升麻鳖甲汤拆方药液每次0.1 ml灌胃, 各组均每日灌胃2次, 连续28天。每日观察小鼠一般情况, 每隔两日记录各组小鼠生存情况。干预28天后检测外周血象(包括白细胞绝对值、血红蛋白、血小板计数); 采用HE染色法观察小鼠肝、脾、骨髓组织病理变化; 分别采用Western Blot法、免疫荧光染色法检测骨髓中线粒体分裂相关蛋白动力相关蛋白1(Drp1)、线粒体分裂蛋白1(Fis1)及线粒体自噬相关蛋白PTEN诱导激酶1(Pink1)、E3泛素连接酶(Parkin)表达水平。**结果** 空白组小鼠生存率为83.33% (10/12), 模型组为25.00% (3/12), 升麻鳖甲汤全方组为66.67% (8/12), 升麻鳖甲汤拆方组为41.67% (5/12), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。模型组小鼠骨髓、脾脏、肝脏组织中可见白血病细胞浸润, 脾脏组织结构破坏, 肝脏组织可见散在局灶性变性坏死。各药物干预组小鼠骨髓、脾脏及肝脏组织中白血病细胞浸润均有所减轻, 脾脏组织结构轻度破坏, 其中升麻鳖甲汤全方组改善更为显著。与空白组比较, 其余各组小鼠外周血白细胞绝对值升高, 血红蛋白、血小板计数以及骨髓Drp1、Fis1、Pink1、Parkin蛋白表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 升麻鳖甲汤全方组白细胞绝对值降低, 血红蛋白、血小板计数以及骨髓Drp1、Fis1、Pink1、Parkin蛋白表达升高; 升麻鳖甲汤拆方组白细胞绝对值降低, 血红蛋白、血小板计数以及骨髓Fis1、Parkin蛋白表达升高($P < 0.05$)。升麻鳖甲汤全方组白细胞绝对值低于升麻鳖甲汤拆方组, 骨髓Drp1、Pink1蛋白表达高于升麻鳖甲汤拆方组($P < 0.05$)。**结论** 升麻鳖甲汤能够改善AML模型小鼠生存状态和生存时间, 改善肝脏、脾脏、骨髓组织病理损伤, 且升麻鳖甲汤全方相较于拆方的治疗作用更加显著, 其机制可能与调高线粒体动力学分裂、诱导细胞自噬有关。

[关键词] 急性髓系白血病; 升麻鳖甲汤; 自噬; 线粒体分裂; 阴阳毒

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种血液系统恶性克隆性疾病, 具有较高的发病率和死亡率, 已成为严重威胁人类生命和健康的疾

病之一^[1]。增殖过度、凋亡受限、自噬异常等细胞调节异常是AML的主要生物学特性, 故调节自噬在AML治疗中起着关键作用, 靶向自噬是对抗AML的可行策略^[2]。研究表明, 线粒体融合分裂与细胞周期、自噬、凋亡等关系密切, AML作为恶性血液系统疾病, 其发生发展也与线粒体融合分裂关系密切^[3]。线粒体分裂过程主要由动力相关蛋

基金项目: 国家自然科学基金(81903984); 山东省自然科学基金(ZR2019PH018); 山东省医药卫生科技发展计划(202003040045, 2018WS184)

✉ 通讯作者: csytem@126.com

白 1 (Drp1)、线粒体分裂蛋白 1 (Fis1)、线粒体分裂因子 (Mff) 调控^[4]。缺氧可使线粒体发生核周聚集,在某些特殊应激条件下可沿微管移至溶酶体,发生线粒体自噬^[5-6]。线粒体自噬主要由 PTEN 诱导激酶 1 (Pink1)/E3 泛素连接酶 (Parkin) 介导^[7]。因此,线粒体分裂与自噬调控异常在 AML 的发病机制中可能发挥了关键作用。

升麻鳖甲汤首载于《金匱要略·百合狐惑阴阳毒病脉证并治》,曰:“阳毒之为病,面赤斑斑如锦纹,咽喉痛,吐脓血,五日可治,七日不可治,升麻鳖甲汤主之。阴毒之为病,面目青,身痛如被杖,咽喉痛,五日可治,七日不可治,升麻鳖甲汤去雄黄、蜀椒主之”。AML 临床表现与阴阳毒病的特征相似,现代医家应用升麻鳖甲汤治疗 AML 取得了良好的临床疗效^[8-9]。本研究从线粒体分裂及自噬角度探讨升麻鳖甲汤治疗 AML 的可能作用机制,并分别从中医学治疗阳毒的升麻鳖甲汤及治疗阴毒的升麻鳖甲汤去雄黄、蜀椒方分析其可能作用机制,为其临床应用提供依据。本研究经山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准(伦理批号:2021-51)。

1 资料与方法

1.1 细胞与动物

KG-1a 细胞株由山东大学齐鲁医院血液肿瘤实验中心馈赠。SPF 级雌性 NSG 免疫缺陷小鼠,6~8 周龄,体质量 18~20 g,购于常州卡文斯实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(苏)2021-0013。小鼠饲养于山东中医药大学附属医院(山东省中医院) SPF 级动物实验中心,温度 23~26℃,湿度 45%~70%,通风换气量≥20 次/h,适应性饲养 7 天后进行实验。

1.2 药物

根据“阴阳毒病”将治疗阳毒病的升麻鳖甲汤定为升麻鳖甲汤全方组,治疗阴毒病的升麻鳖甲汤去雄黄、蜀椒方定为升麻鳖甲汤拆方组。升麻鳖甲汤全方:升麻 31.25 g、鳖甲 15.625 g、蜀椒 15.625 g、当归 31.25 g、雄黄 7.81 g、甘草 31.25 g;升麻鳖甲汤拆方组:升麻 31.25 g、鳖甲 15.625 g、甘草 31.25 g、当归 31.25 g。以上药物由山东中医药大学附属医院中药制剂实验室制备,最终制备成含生药浓度为升麻鳖甲汤全方组 1.73 g/ml、升麻鳖甲汤拆方组 1.43 g/ml 溶液,4℃保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

IMDM 培养基(批号:12440053)、胎牛血清(批号:10100147),Gibco 公司;RIPA 裂解液(批号:EA0002)、一抗稀释液(批号:ED0013)、二抗稀释液(批号:ED0014)、ECL 发光液(批号:ED0015-B),思科捷生物技术有限公司;无蛋白快速封闭液(批号:PS108),上海雅酶生物医药科技有限公司;通用型组织固定液(批号:G1101)、苏木精-伊红染液(批号:G1003)、肝素钠管(批号:QX0012),武汉塞维尔生物科技有限公司;青、链霉素混合液(批号:20211016),Solarbio 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0010),碧云天生物技术有限公司;Drp1 抗体(批号:12957-1-AP)、Fis1 抗体(批号:10956-1-AP)、Pink1 抗体(批号:23274-1-AP)、Parkin 抗体(批号:66674-1-Ig)、二抗(批号:SA00001-2),Proteintech 公司;DCFH-DA 染液(批号:C1300-1),北京普利莱基因技术有限公司;Rh123 染液(批号:R-22420),MedChemExpress 公司;

JB-P5 型包埋机,武汉俊杰电子有限公司;RM2016 型病理切片机,上海徕卡仪器有限公司;KD-P 型组织摊片机,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;Eclipse E100 型光学显微镜、DS-U 型成像系统、ECLIPSE C 型正置荧光激光共聚焦显微镜,日本尼康公司;IX50 型倒置显微镜,日本奥林巴斯公司;D1008E 型离心机,武汉赛维尔公司;BM860 型全自动血细胞分析仪,北京宝灵曼阳光科技有限公司;X-RAD225 型小动物辐照仪,美国 PXi 公司。

1.4 细胞培养

KG-1a 细胞株常规培养于含 15% 胎牛血清的 IMDM 培养基中,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中,1~2 天换液、传代 1 次,倒置显微镜观察细胞生长状态。取对数生长期的 KG-1a 细胞,细胞重新悬浮于生理盐水中,调整浓度为 5×10⁶ 个/ml。

1.5 动物分组及干预方法

48 只 NSG 免疫缺陷小鼠按照体质量采用随机数字表法分为空白组、模型组、升麻鳖甲汤全方组、升麻鳖甲汤拆方组,每组 12 只。除空白组外,其余各组小鼠采用小动物辐照仪予 200 cGy ⁶⁰Co 全身照射后放入固定器,一次性尾静脉注射对数生长期的 KG-1a 细胞 1×10⁶ 个(0.2 ml)建立 AML 小鼠模型^[10-11],空白组小鼠尾静脉注射等量生理盐水。接种 1 周后检测外周血象及组织病理学进行成模鉴

定,造模小鼠较正常小鼠白细胞升高且差异具有统计学意义、骨髓中出现大量白血病细胞浸润提示造模成功^[12]。造模成功后模型组和空白组小鼠予生理盐水每次0.1 ml灌胃;升麻鳖甲汤全方组予浓度为1.73 g/ml的升麻鳖甲汤药液每次0.1 ml灌胃,升麻鳖甲汤拆方组予浓度为1.43 g/ml的升麻鳖甲汤拆方药液每次0.1 ml灌胃,药物剂量根据《药理实验方法学》^[13]不同种属动物间药物等效剂量直接折算法计算。各组均每日灌胃2次,连续28天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 一般生存状况 每日观察小鼠精神状态、饮食、活动量、大小便等一般情况,每隔两日记录各组小鼠生存情况。

1.6.2 外周血象检测 采用眶底静脉取血法进行血常规计数,于末次灌胃次日经眶底静脉丛取血,用毛细玻璃管从目内眦或目外眦刺入,刺中眶底静脉丛后,取血1 ml,放入肝素钠管抗凝,使用全自动血细胞分析仪进行血常规检测,检测指标包括外周血中白细胞绝对值、血红蛋白值、血小板计数。

1.6.3 组织病理学检测 取血后摘取小鼠肝、脾、骨髓,放入通用型组织固定液固定,之后标本脱水、包埋、切片,行苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察各组小鼠肝、脾、骨髓组织的组织病理形态变化。

1.6.4 Western Blot 法检测线粒体分裂蛋白 Drp1、Fis1 及自噬相关蛋白 Pink1、Parkin 表达 取小鼠骨髓悬液, PBS 漂洗,应用 RIPA 裂解液裂解处理各组细胞,收集裂解上清液,获得细胞总蛋白。应用 BCA 蛋白定量法测定各组蛋白浓度,加入 5× loading 缓冲液于总蛋白中,煮沸 10 min 变性,根据样本浓度上样,电泳湿转至 PVDF 膜,无蛋白快速封闭液封闭 20 min,加入一抗(稀释比例: Drp1 1: 5000, Fis1 1: 2000, Pink1 1: 1000, Parkin 1: 5000) 4℃反应过夜, TBST 洗膜 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(稀释比例 1: 5000),室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,化学发光法曝光显影, Image J (Version 1.53c) 软件进行灰度值分析。

1.6.5 免疫荧光染色法检测 Drp1、Fis1、Pink1、Parkin 蛋白表达 取小鼠骨髓悬液, PBS 漂洗,加入 DCFH-DA 染液, 37℃孵育 60 min, 荧光显微镜下观察。取小鼠骨髓悬液, PBS 漂洗,加入 Rh123 荧光染液, 37℃孵育 45 min。在激光共聚焦显微镜下观察。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 计量资料均符合正态分布以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 经 Levene 检验方差齐性, 方差齐时采用单因素方差分析, 方差不齐时采用 Kruskal-Wallis 检验, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。小鼠生存情况采用 GraphPad Prism 8 软件分析, 用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, log-rank 检验比较各组生存曲线的差异性。

2 结果

2.1 各组小鼠一般生存状况比较

空白组小鼠精神状态良好, 毛发充足、色泽良好, 饮食正常, 最终存活 10 只, 死亡 2 只。模型组所有小鼠接种 KG-1a 细胞株约 2 周后, 出现精神萎靡、脱毛、食欲不振、消瘦、竖毛、弓背体态、肢体瘫痪、淋巴结肿大等表现, 最终存活 3 只, 死亡 9 只。与模型组比较, 升麻鳖甲汤全方组、升麻鳖甲汤拆方组小鼠弓背体态不明显, 肢体瘫痪和淋巴结肿大也较轻, 且升麻鳖甲汤全方组小鼠较升麻鳖甲汤拆方组淋巴结肿大更轻、肢体活动更自如。最终升麻鳖甲汤全方组小鼠存活 8 只、死亡 4 只, 升麻鳖甲汤拆方组小鼠存活 5 只、死亡 7 只。模型组小鼠生存率为 25.00%, 空白组生存率为 83.33%, 升麻鳖甲汤全方组生存率为 66.67%, 升麻鳖甲汤拆方组生存率为 41.67%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组小鼠生存曲线见图 1。

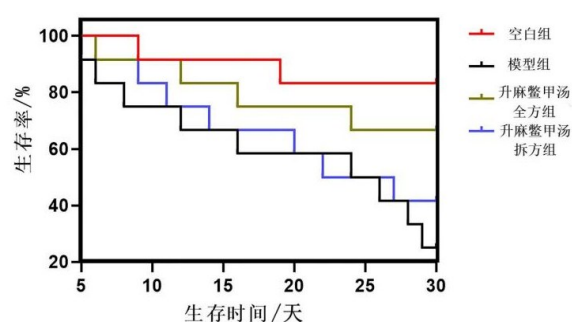


图1 各组小鼠生存曲线

Figure 1 Survival curves of mice in each group

2.2 各组小鼠外周血象检测结果比较

表1示, 与空白组比较, 其余各组小鼠外周血白细胞绝对值升高, 血红蛋白、血小板计数降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 升麻鳖甲汤全方组、升麻鳖甲汤拆方组小鼠外周血白细胞绝对值降低, 血红蛋白、血小板计数升高 ($P < 0.05$)。升麻鳖甲汤全方组白细胞绝对值显著低于升麻鳖甲汤拆方

表 1 各组小鼠外周血中白细胞绝对值、血红蛋白、血小板计数比较

Table 1 Comparison of the absolute value of white blood cells, hemoglobin and platelet counts in the peripheral blood of mice

in each group					($\bar{x} \pm s$)
组别	鼠数	白细胞绝对值/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	血红蛋白/ $g \cdot L^{-1}$	血小板计数/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	
空白组	10	2.434 $\pm$ 0.30	141.503 $\pm$ 4.99	1251.85 $\pm$ 137.96	
模型组	3	6.417 $\pm$ 0.62 ^{a)}	96.737 $\pm$ 8.88 ^{a)}	647.98 $\pm$ 10.79 ^{a)}	
升麻鳖甲汤全方组	8	3.463 $\pm$ 0.68 ^{a) b)}	129.234 $\pm$ 7.08 ^{a) b)}	862.57 $\pm$ 47.58 ^{a) b)}	
升麻鳖甲汤拆方组	5	4.838 $\pm$ 0.66 ^{a) b) c)}	126.498 $\pm$ 5.25 ^{a) b)}	851.76 $\pm$ 31.53 ^{a) b)}	

注: a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与升麻鳖甲汤全方组比较, $P < 0.05$ 。

组 ($P < 0.05$), 而两者血红蛋白、血小板计数比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

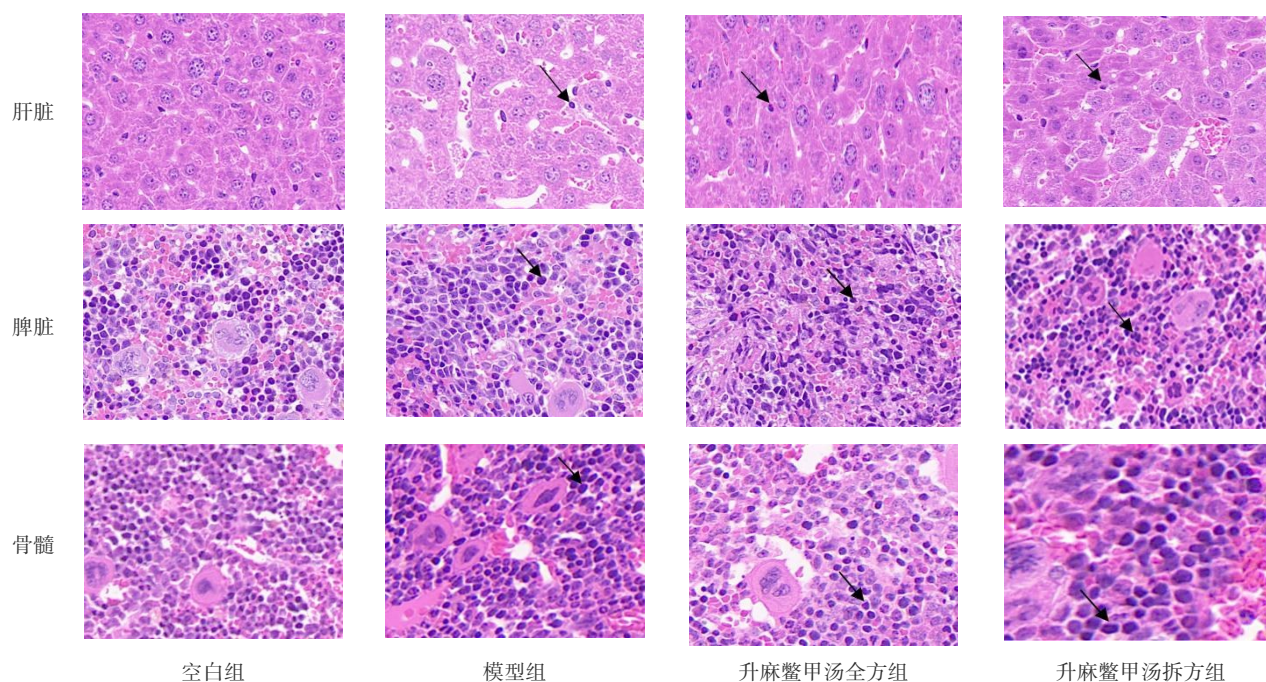
2.3 各组小鼠肝脏、脾脏、骨髓病理学结果比较

图 2 示, 空白组小鼠肝脏、脾脏、骨髓组织无明显异常。模型组小鼠骨髓、脾脏及肝脏组织中可见白血病细胞浸润, 脾脏组织结构破坏, 肝脏组织可见散在局灶性变性坏死。升麻鳖甲汤全方组、升麻鳖甲汤拆方组小鼠骨髓、脾脏及肝脏组织中白血

病细胞浸润均有所减轻, 脾脏组织结构轻度破坏, 其中升麻鳖甲汤全方组小鼠较升麻鳖甲汤拆方组小鼠白血病细胞浸润减少, 改善作用更加显著。

2.4 各组小鼠骨髓 Fis1、Drp1、Pink1、Parkin 蛋白 Western Blot 法检测结果比较

表 2 示, 与空白组比较, 其余各组小鼠骨髓 Drp1、Fis1、Pink1、Parkin 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 升麻鳖甲汤全方组各蛋白



注: 图中黑色箭头指示为白血病细胞浸润。

图 2 各组小鼠肝脏、脾脏、骨髓组织病理变化 (HE 染色, $\times 50$)

Figure 2 Histopathological changes of liver, spleen and bone marrow of mice in each group

表 2 各组小鼠骨髓 Fis1、Drp1、Pink1、Parkin 蛋白表达比较

Table 2 Comparison of protein expression of Fis1, Drp1, Pink1 and Parkin in bone marrow of mice in each group ($/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Fis1	Drp1	Pink1	Parkin
空白组	10	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.01
模型组	3	0.42 $\pm$ 0.06 ^{a)}	0.29 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.18 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.47 $\pm$ 0.09 ^{a)}
升麻鳖甲汤全方组	8	0.81 $\pm$ 0.06 ^{a) b)}	0.55 $\pm$ 0.02 ^{a) b)}	0.43 $\pm$ 0.08 ^{a) b)}	0.83 $\pm$ 0.02 ^{a) b)}
升麻鳖甲汤拆方组	5	0.80 $\pm$ 0.04 ^{a) b)}	0.37 $\pm$ 0.01 ^{a) c)}	0.22 $\pm$ 0.03 ^{a) c)}	0.75 $\pm$ 0.06 ^{a) b)}

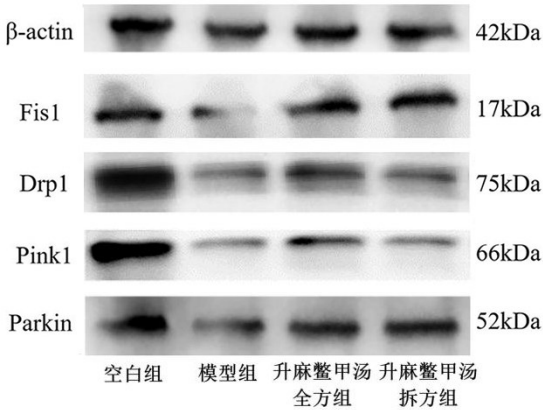
注: Fis1, 线粒体分裂蛋白 1; Drp1, 动力相关蛋白 1; Pink1, PTEN 诱导激酶 1; Parkin, E3 泛素连接酶。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与升麻鳖甲汤全方组比较, $P < 0.05$ 。

表达均升高 ($P<0.05$); 升麻鳖甲汤拆方组 Fis1、Parkin 蛋白表达升高 ($P<0.05$), Drp1、Pink1 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。升麻鳖甲汤拆方组 Drp1、Pink1 蛋白表达低于升麻鳖甲汤全方组 ($P<0.05$)。各组小鼠骨髓 Drp1、Fis1、Pink1、Parkin 蛋白电泳图见图 3。

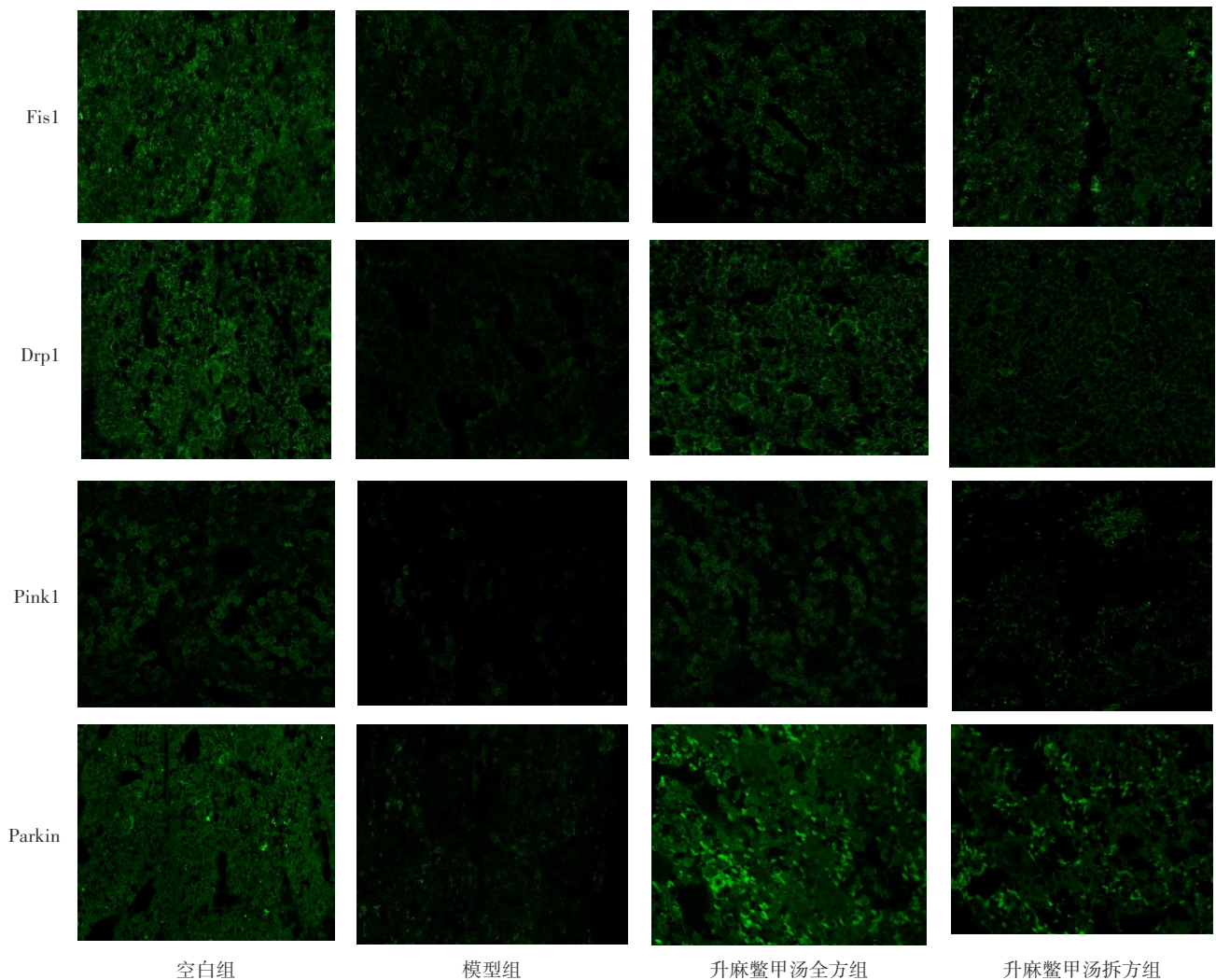
2.5 各组小鼠骨髓 Fis1、Drp1、Pink1、Parkin 蛋白表达免疫荧光检测结果比较

图 4 示, 图中绿色荧光代表各蛋白表达, 与空白组比较, 模型组 Drp1、Fis1、Pink1、Parkin 蛋白表达减少; 与模型组比较, 升麻鳖甲汤全方组和升麻鳖甲汤拆方组骨髓中各蛋白表达增多, 且升麻鳖甲汤全方组骨髓中各蛋白表达较升麻鳖甲汤拆方组显著增多。



注: Fis1, 线粒体分裂蛋白 1; Drp1, 动力相关蛋白 1; Pink1, PTEN 诱导激酶 1; Parkin, E3 泛素连接酶。

图 3 各组小鼠骨髓 Fis1、Drp1、Pink1、Parkin 蛋白电泳图
Figure 3 Electrophoresis of Fis1, Drp1, Pink1 and Parkin proteins in bone marrow of mice in each group



注: 图中绿色荧光表示各蛋白表达。Fis1, 线粒体分裂蛋白 1; Drp1, 动力相关蛋白 1; Pink1, PTEN 诱导激酶 1; Parkin, E3 泛素连接酶。

图 4 各组小鼠骨髓 Drp1、Fis1、Pink1、Parkin 蛋白表达免疫荧光图
Figure 4 Immunofluorescence images of Drp1, Fis1, Pink1, and Parkin protein expression in bone marrow of mice in each group

3 讨论

AML 主要是一种由髓系造血干细胞和/或祖细胞衍生的高度异质性恶性肿瘤, 严重威胁人类生命^[14]。AML 常被归为中医学“虚劳”“血证”“癥积”等范畴^[15], 病机特点为“毒、瘀、虚”^[16]。《金匱要略》中阴阳毒病与现代医学 AML 的中医病机和临床特点相似^[17]。在“阴阳毒病”理论指导下, 本研究以治疗阳毒病的升麻鳖甲汤为升麻鳖甲汤全方组, 治疗阴毒的升麻鳖甲汤去雄黄、蜀椒为升麻鳖甲汤拆方组, 探讨升麻鳖甲汤治疗 AML 的可能作用机制。升麻鳖甲汤全方以升麻为君药, 透邪解毒; 鳖甲为臣药, 既可养阴清热, 又可引诸药入阴分以解毒; 佐以当归养血活血; 雄黄、蜀椒消散瘀血、因势利导; 甘草补脾益气, 调和诸药, 为佐使药。

本研究结果显示, 模型组小鼠出现明显的精神萎靡、脱毛、食欲不振、消瘦、竖毛、弓背体态、肢体瘫痪、淋巴结肿大等表现。而升麻鳖甲汤全方及拆方干预后小鼠生存状态中弓背体态不明显, 肢体瘫痪和淋巴结肿大也较轻, 且升麻鳖甲汤全方干预后小鼠生存状态相对最佳, 表明升麻鳖甲汤能够显著改善 AML 模型小鼠的生存状态。从各组小鼠生存时间和外周血象结果可以看出, 空白组小鼠生存率最高, 模型组小鼠生存率最低, 且小鼠出现白细胞升高、贫血等表现; 使用升麻鳖甲汤全方及拆方干预后, 小鼠生存率得到一定改善, 且升麻鳖甲汤全方组生存率 (66.67%) 显著高于升麻鳖甲汤拆方组 (41.67%), 两干预组小鼠外周血白细胞绝对值降低、贫血改善, 其中升麻鳖甲汤全方组在降低白细胞绝对值方面优于升麻鳖甲汤拆方组。另外, HE 染色法观察小鼠肝脏、脾脏和骨髓组织病理变化发现, 空白组小鼠肝脏、脾脏、骨髓组织未见明显异常, 模型组小鼠骨髓、脾脏组织中出现白血病细胞浸润, 肝脏组织可见散在局灶性变性坏死, 表现为 AML 典型表现; 而经升麻鳖甲汤全方及拆方干预后小鼠骨髓、脾脏及肝脏组织中病理损害均有所减轻, 其中升麻鳖甲汤全方改善作用更明显。以上结果显示, 升麻鳖甲汤及其拆方均能够有效地改善 AML 模型小鼠的生存状态、提高小鼠生存率, 改善贫血并减少白细胞绝对值, 减轻肝脏、脾脏和骨髓中的白血病细胞浸润与组织结构破坏, 且以升麻鳖甲汤全方效果更佳。

有研究显示, 活性氧的产生和线粒体动力学的

改变可以导致 AML 细胞的代谢弱点^[18]。Drp1 是动力蛋白超家族的成员, 是参与线粒体分裂的必要蛋白, Drp1 可通过磷酸化、s-亚硝基化和泛素化调节线粒体分裂, 而过表达 Drp1 可增加线粒体分裂, 导致线粒体碎裂^[19]。Fis1 缺失会损害线粒体自噬, 削弱白血病干细胞的自我更新能力^[20]。自噬被认为是诱导细胞死亡的主要机制之一, 自噬可由不同的应激源诱导, 包括营养剥夺、氧化应激和缺氧^[21]。自噬抑制增强了癌症细胞包括 AML 的化疗敏感性^[22]。Pink1、Parkin 是具有促自噬作用的促自噬蛋白, Parkin 向功能失调的线粒体的募集, 触发线粒体自噬^[23], Pink1 启动线粒体自噬, 长时间暴露于缺氧环境下的 AML 细胞自噬水平发生变化, 降低阿糖胞苷的化疗敏感性, 自噬对线粒体内稳态和 AML 细胞在缺氧条件下的存活至关重要^[24]。研究发现, 中药能够增强肿瘤细胞自噬以诱导肿瘤细胞凋亡, 也可以抑制肿瘤细胞保护性自噬, 逆转肿瘤耐药性^[25]。

Western Blot 法与免疫荧光检测结果均显示, 模型组小鼠骨髓 Fis1、Drp1、Pink1、Parkin 蛋白表达均较空白组降低, 经升麻鳖甲汤全方干预后小鼠骨髓 Fis1、Drp1、Pink1、Parkin 蛋白表达均明显升高。但升麻鳖甲汤拆方干预后线粒体分裂相关蛋白 Drp1、自噬相关蛋白 Pink1 表达差异不明显, 提示蜀椒、雄黄这两味药在 Drp1、Pink1 蛋白表达的调控中可能起着主要的调节作用, 升麻、鳖甲、蜀椒、雄黄这四味药在 Fis1、Parkin 蛋白表达的调控中可能起着主要的调节作用。但由于本研究样本量较少, 这一结论仍需进一步研究进行证实。

综上所述, 升麻鳖甲汤能够改善 AML 模型小鼠的生存状态和生存时间, 改善肝脏、脾脏、骨髓组织病理损伤, 且全方相较于拆方的治疗作用更加显著, 其机制可能是通过调高线粒体动力学分裂, 诱导细胞自噬, 从而起到治疗 AML 的作用。由于小鼠与人类的生理差异, 需进一步进行临床验证, 为升麻鳖甲汤对线粒体动力学的作用机制提供临床依据。

参考文献

- [1]ZHANG S, LIU M, YAO Y, et al. Targeting LSD1 for acute myeloid leukemia (AML) treatment[J]. Pharmacol Res, 2021, 164: 105335. doi: 10.1016/j.phrs. 2020. 105335.
- [2]DU W, XU A, HUANG Y, et al. The role of autophagy in targeted therapy for acute myeloid leukemia[J]. Autophagy,

- 2021, 17(10):2665-2679.
- [3] HAN XJ, SHI SL, WEI YF, et al. Involvement of mitochondrial dynamics in the antineoplastic activity of cisplatin in murine leukemia L1210 cells[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2):985-992.
- [4] CHUANG KC, CHANG CR, CHANG SH, et al. Imiquimod-induced ROS production disrupts the balance of mitochondrial dynamics and increases mitophagy in skin cancer cells[J]. *J Dermatol Sci*, 2020, 98(3): 152-162.
- [5] HERNÁNDEZ MI, ZORZANO A. Mitochondrial dynamics and liver cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(11): 2571.
- [6] GAO S, HU J. Mitochondrial fusion: the machineries in and out[J]. *Trends Cell Biol*, 2021, 31(1): 62-74.
- [7] 庞延, 卢健棋, 唐梅玲, 等. 强心汤对慢性心力衰竭模型大鼠梗死心肌区组织活性氧及PINK1/parkin介导的线粒体自噬的影响[J]. *中医杂志*, 2023, 64(7):722-728.
- [8] 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.
- [9] 周瑾, 郭连宇, 刘照胜. 老年急性髓系白血病患者采用升麻鳖甲汤、地西他滨联合阿糖胞苷+阿克拉霉素+粒细胞集落刺激因子的化疗方案的临床疗效比较研究[J]. *中国生化药物杂志*, 2017, 37(5):186-190.
- [10] 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.
- [11] MCDERMOTT SP, EPPERT K, LECHMAN ER, et al. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains [J]. *Blood*, 2010, 116(2):193-200.
- [12] SALAND E, BOUTZEN H, CASTELLANO R, et al. A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia [J]. *Blood Cancer J*, 2015, 5(3):e297. doi: 10.1038/bcj.2015.19.
- [13] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 202-203.
- [14] SHORT NJ, KANTARJIAN HM, LOGHAVI S, et al. Treatment with a 5-day versus a 10-day schedule of decitabine in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia: a randomised phase 2 trial [J]. *Lancet Haematol*, 2019, 6(1):e29-e37.
- [15] 张晓丹, 周永明, 严静贤. 中医药治疗急性髓系白血病的研究进展[J]. *中国中医急症*, 2020, 29(5):925-929.
- [16] 庄海峰. 急性白血病中医病机探讨[J]. *江西中医药*, 2019, 50(2):15-16.
- [17] 李宁. 《金匱要略》阴阳毒病证浅识[J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(3):50-51.
- [18] PANINA SB, PEI J, KIRIENKO NV. Mitochondrial metabolism as a target for acute myeloid leukemia treatment [J]. *Cancer Metab*, 2021, 9(1):17.
- [19] SHI Y, FAN S, WANG D, et al. FOXO1 inhibition potentiates endothelial angiogenic functions in diabetes via suppression of ROCK1/Drp1-mediated mitochondrial fission [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(7):2481-2494.
- [20] DU W, XU A, HUANG Y, et al. The role of autophagy in targeted therapy for acute myeloid leukemia [J]. *Autophagy*, 2021, 17(10):2665-2679.
- [21] DAS G, SHRAVAGE BV, BAEHRECKE EH. Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(6):a008813. doi: 10.1101/cshperspect.a008813.
- [22] BELOUNIS A, NYALENDO C, LE GALL R, et al. Autophagy is associated with chemoresistance in neuroblastoma [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1):891.
- [23] PARK YS, CHOI SE, KOH HC. PGAM5 regulates PINK1/Parkin-mediated mitophagy via DRP1 in CCCP-induced mitochondrial dysfunction [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 284: 120-128. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.12.004.
- [24] DYKSTRA KM, FAY HRS, MASSEY AC, et al. Inhibiting autophagy targets human leukemic stem cells and hypoxic AML blasts by disrupting mitochondrial homeostasis [J]. *Blood Adv*, 2021, 5(8):2087-2100.
- [25] 何曼, 陈莉, 曾沙, 等. 中药调控肿瘤细胞自噬的研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(10):3142-3150.

Effect of Shengma Biejia Decoction (升麻鳖甲汤) on Bone Marrow Mitochondrial Fission and Expression of Autophagy-related Proteins in Acute Myeloid Leukemia Model Mice

SI Yuping¹, CUI Siyuan^{2,3}, WEI Wenjian¹, YIN Xuwei¹, LI Zonghong¹, MA Guodong¹, WANG Yan², ZHENG Wei², WANG Zhenzhen², LIU Yueli², WANG Jingyi², XU Ruirong²

1. The First School of Clinical Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250014; 2. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 3. School of Clinical Medicine, Shandong University

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Shengma Biejia Decoction* (升麻鳖甲汤, SBD)

in the treatment of acute myeloid leukemia (AML). **Methods** Forty-eight NSG immunodeficient mice were randomly divided into blank group, model group, whole and disassembled SBD groups, with 12 mice in each group. Except for the blank group, the whole body of the mice in the other groups were irradiated by a small animal irradiator (200 cGy ^{60}Co), and then injected with 1×10^6 (0.2 ml) of KG-1a cells in the logarithmic growth phase into the tail vein to establish the AML mouse model. One week later, the successfully modeled mice in the model group and the blank control group were given 0.1 ml of normal saline per time by gavage, while those in the whole and disassembled SBD groups were given 0.1 ml of SBD with a concentration of 1.73 g/ml and 1.43 g/ml per time by gavage, respectively, twice daily for 28 days. The general condition of the mice was observed every day, and the survival condition was recorded every two days. After 28 days, the peripheral blood indicators including the absolute value of white blood cells, hemoglobin value, and platelet count were detected. HE staining was used to observe the pathological changes of liver, spleen and bone marrow in mice. Western blot and immunofluorescence (IF) were used to detect the expression levels of mitochondrial mitosis related proteins including dynamin-related protein 1 (Drp1) and mitochondrial fission protein 1 (Fis1), as well as mitophagy-related proteins PTEN-induced kinase (Pink1) and E3 ubiquitin ligase (Parkin). **Results** The survival rate of the blank group was 83.33% (10/12), while that of the model group, the whole and disassembled SBD groups was 25.00% (3/12), 66.67% (8/12), and 41.67% (5/12), respectively, showing statistically significant difference ($P < 0.05$). In the model group, infiltrated leukemia cells were found in the bone marrow, spleen and liver, and spleen tissue structure was damaged, with scattered focal degeneration and necrosis in the liver. In the SBD groups, the infiltration of leukemic cells in bone marrow, spleen and liver of mice in each group was alleviated, and the tissue structure was slightly damaged; more improvements were seen in the whole SBD group. Compared to those in the blank group, the absolute value of peripheral white blood cells in the other groups increased, while the hemoglobin level, platelet count, and the expression of Drp1, Fis1, Pink1 and Parkin decreased significantly ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the absolute value of white blood cells decreased, while hemoglobin, platelet count and expression of proteins Drp1, Fis1, Pink1, and Parkin increased in the whole SBD group ($P < 0.05$); the absolute value of white blood cells decreased, while hemoglobin, platelet count, and the expression of protein Fis1 and Pinkin increased in the dissembled SBD group ($P < 0.05$). The absolute value of white blood cells was lower, and the bone marrow Drp1 and Pink1 protein expressions were higher in the whole SBD group than in the dissembled SBD group than ($P < 0.05$). **Conclusion** SBD can improve the survival condition and survival time of AML model mice, and improve the histopathological damage of liver, spleen and bone marrow, and the whole SBD group shows better effect than the disassembled prescription. Its mechanism may be related to the up-regulation of mitochondrion dynamic division and the promotion of autophagy.

Keywords acute myeloid leukemia; *Shengma Biejia Decoction* (升麻鳖甲汤); autophagy; mitochondrial fission; yin-yang toxin

(收稿日期: 2022-12-05; 修回日期: 2023-04-27)

[编辑: 邓媛]