

## 微残清颗粒逆转白血病干细胞耐药的机制研究

闫理想<sup>1</sup>,姜静<sup>2</sup>,冯全管<sup>3</sup>,杨向东<sup>1</sup>,何敬<sup>1</sup>,杨曦<sup>1</sup>,李德冠<sup>4</sup>,史哲新<sup>1\*</sup>

(1.天津中医药大学第一附属医院 国家中医针灸临床医学研究中心,天津 300381;

2.天津市中医药研究院附属医院,天津 300120;

3.山西省中西医结合医院,山西 太原 030002;

4.中国医学科学院放射医学研究所,天津 300193)

**摘要:**本文探讨了微残清颗粒在逆转白血病干细胞对柔红霉素(DNR)耐药中的作用机制。采用微残清颗粒免含药血清干预CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a白血病干细胞的方法,将免疫磁珠分选后的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a细胞分为对照组、DNR组、微残清颗粒组、微残清颗粒+DNR组,并应用siRNA法沉默磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)表达,检测各组细胞增殖率、细胞周期/凋亡比例、胞内磷脂酰肌醇激酶(PI3K)/磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)/磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR) mRNA及蛋白量。结果显示,微残清颗粒含药血清联合DNR可明显提高CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a细胞的增殖抑制率、G2/M期比例、总凋亡和早期凋亡率。同时,微残清颗粒含药血清协同DNR提高PTEN mRNA及蛋白表达,降低PI3K、p-AKT、p-mTOR mRNA及蛋白表达。以上结果提示微残清颗粒具有逆转LSCs对DNR耐药的作用,作用机制可能与PTEN负调控PI3K/AKT/mTOR通路相关。

**关键词:**微残清颗粒;白血病干细胞;耐药;PTEN;PI3K/AKT/mTOR通路

中图分类号:R733.71

文献标志码:A

文章编号:0253-2395(2024)01-0238-10

## Study on the Mechanism of Reversing Drug Resistance of Leukemia Stem Cells by WeiCanQing Granule

YAN Lixiang<sup>1</sup>, JIANG Jing<sup>2</sup>, FENG Quanguan<sup>3</sup>, YANG Xiangdong<sup>1</sup>, HE Jing<sup>1</sup>,

YANG Xi<sup>1</sup>, LI Deguan<sup>4</sup>, SHI Zhixin<sup>1\*</sup>

(1. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China;

2. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300120, China;

3. Shanxi Provincial Integrated TCM and WM Hospital, Taiyuan 030002, China;

4. Institute of Radiation Medicine, China Medical Academy of Sciences, Tianjin 300193, China.)

**Abstract:** This study explores the mechanism of action of WeiCanQing granule in reversing the resistance of leukemia stem cells to daunorubicin (DNR). Using the method of intervening CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a leukemia stem cells with rabbit serum containing WeiCanQing granule, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a cells sorted by immunomagnetic beads were divided into control group, DNR group, WeiCanQing granule group, and WeiCanQing granule+DNR group. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression was silenced using

收稿日期:2023-03-06;接受日期:2023-05-10

基金项目:天津中医药大学第一附属医院“拓新工程”基金项目(院2020057);天津市教委科研计划项目(2021KJ145);天津市科技计划项目(21JCQNJC01210)

作者简介:闫理想(1988-),男,河南正阳人,硕士,主治医师,研究方向为中西医结合血液病。E-mail: yixuewenkuskys@sian.cn

\* 通信作者:史哲新(SHI Zhixin), E-mail: shzhx0604@126.com

引文格式:闫理想,姜静,冯全管,等.微残清颗粒逆转白血病干细胞耐药的机制研究[J].山西大学学报(自然科学版),2024,47(1):238-247. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2023097

siRNA method, and cell proliferation rate, cell cycle/apoptosis ratio, and Intracellular phosphatidylinositol kinase (PI3K)/phosphorylated protein kinase B (p-AKT)/phosphorylated rapamycin target protein (p-mTOR) mRNA and protein levels were examined. The results showed that the combination of WeiCanQing granule containing serum and DNR significantly increased the proliferation inhibition rate, G2/M phase ratio, total apoptosis, and early apoptosis rate of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a cells. At the same time, the drug containing serum of WeiCanQing granule synergistically enhanced the expression of PTEN mRNA and protein, and reduces the expression of PI3K, p-AKT, p-mTOR mRNA and protein. The above results suggest that WeiCanQing granule have the effect of reversing LSCs' resistance to DNR, and the mechanism of action may be related to negative regulation of PTEN on the PI3K/AKT/mTOR pathway.

**Key words:** WeiCanQing granule; leukemia stem cells; drug resistance; PTEN; PI3K/AKT/mTOR

## 0 引言

近些年急性髓系白血病(AML)的发病率逐年上升,虽然新药和新型治疗手段不断涌现,但目前以蒽环类为主的化疗方案仍是不可取代的治疗方式。然而,在取得缓解的患者中却有接近60%的病人发生各种原因的复发,最终患者5年总生存率低于40%<sup>[1]</sup>。研究发现,其根本原因在于具有自我更新和增殖能力的白血病干细胞(LSCs)<sup>[2]</sup>,LSCs是AML的起始细胞,在AML的发生、发展及耐药、复发中发挥重要的作用。LSCs可以通过细胞周期、膜转运蛋白、多种细胞信号通路等机制产生耐药。因此,清除LSCs或逆转LSCs耐药成为治愈白血病的关键。磷酸酯酶与张力蛋白同源物(Phosphatase and tensin homolog, PTEN)是一种在人体中由PTEN基因编码的蛋白质,该蛋白具有磷酸酶和脂质磷酸酶活性,是第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,是与肿瘤发生密切相关的一种抑癌基因,其主要机制为PTEN可以负调控PI3K/Akt通路从而阻抑肿瘤的发生。

白血病在中医古籍中并无记载,但依据多年的临床经验及同行专家共识,认为其发病的机制是:正气虚损,内邪滋生,邪毒内侵而致病<sup>[3]</sup>。基于白血病复发“髓虚邪伏,邪毒致变”的机制,治则当以益气养阴以扶正,解毒以祛邪。本课题组根据这一中医病理变化提出益气养阴解毒法。经多年临床实践,证实该治法在复发难治白血病的治疗中具有较好的临床效果<sup>[4]</sup>,近年因其确切疗效被列为院内制剂(微残清颗粒)推广应用。微残清颗粒具有益气、养阴、解毒的功效,临床研究发现,微残清颗粒可以调控复发难治白血病患者骨髓细胞周期与

凋亡,抑制骨髓细胞P-gp表达,进而提高化疗药物敏感性<sup>[5]</sup>。前期实验亦表明微残清颗粒可逆转LSC对阿霉素的耐药<sup>[6]</sup>,且对PI3K/Akt/mTOR通路的关键靶点具有调控作用<sup>[7]</sup>,但其具体机制尚不明确。为此,本研究以人急性髓系白血病KG1a细胞为研究对象,以PTEN介导的PI3K/Akt/mTOR通路为切入点,明确微残清颗粒逆转LSC耐药的作用机制。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞及动物

白血病细胞株KG1a由中国医学科学院血液病研究所馈赠。雌雄各半20只新西兰大白兔(6月龄)购于北京华阜康公司(SCXK(京)2014-0004)。饲养于中国医学科学院放射医学研究所动物房(SPF级),正常光照更替,标准饲料喂养,适应性饲养1周后用于实验。实验受中国医学科学院放射医学研究所伦理审批。

#### 1.1.2 药物及试剂

注射用盐酸柔红霉素,20 mg/支(批号15049039),辉瑞制药有限公司;微残清颗粒:黄芪30 g(批号0193153),当归15 g(批号0193504),全蝎9 g(批号0193507),青黛9 g(批号0193127),雄黄0.3 g(批号0193135),人参10 g(批号0193157),茯苓15 g(批号0193167),白术15 g(批号0193145),甘草10 g(批号0193103),均为广东一方药业有限公司(佛山)生产的中药配方颗粒。CD34磁珠(批号T003570)、CD38磁珠(批号T003774)购自德国美天旆公司;CCK8试剂盒(批号C0125)、AnnexinVFITC/PI试剂盒(批号9312857)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号01192120528)、Trizol

试剂(批号 G3020)购自上海碧云天生物公司;特异性针对 PTEN 的 siRNA 序列由上海朗盟生物科技有限公司合成;Lipofectamine TM2000 siRNA 转染试剂盒(批号 11668-019)购自上海笃玛生物公司;CD34-FITC 抗体(批号 ab78165)、CD38-APC 抗体(批号 ab108403)购自英国 abcam 公司;Ultrapure RNA 试剂盒(批号 B0004D)购自北京康为世纪生物科技公司;Power RT 试剂盒(批号 PR6523)、Power 2×SYBR Real-time PCR Premixture 试剂盒(批号 PR7102)购自北京百泰克生物技术公司;PTEN 抗体(批号 ab32199)、PI3K 抗体(批号 ab32089)、p-AKT 抗体(批号 ab235958)、p-mTOR 抗体(批号 ab134903)购自英国 abcam 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 17A061)购自沈阳万类生物科技有限公司。

### 1.1.3 仪器

磁珠分选架及 LD、MS 柱(德国 Miltenyi Biotec 公司);C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司);ELxSOO 自动酶标仪(美国 Bio-Tek Instruments 公司);苏净 SW-CJ-2F 超净工作台(苏州安泰技术有限公司);ABI StepOnePlus 定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);Bio-Rad ChemiDoc MP 荧光成像系统(美国 Bio-rad 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 微残清颗粒含药血清的制备

新西兰大白兔 20 只随机分为 2 组,分别为实验组和对照组。实验组以微残清颗粒水溶液(浓度:6 g/mL)灌胃 3 mL,2 次/日,连续 7 d;对照组以等剂量生理盐水灌胃,2 次/日,连续 7 d。于末次灌胃 2 h 后,心脏取血。分离血清,将同组血清混匀,过滤分装,-20℃保存备用。

### 1.2.2 细胞培养及分组

KG1a 细胞株常规培养于含注射用盐酸柔红霉素(Daunorubicin, DNR) 1 μg/mL 的 RPMI 1640(10%FBS)完全培养基,37℃,体积百分数 5% CO<sub>2</sub>,3 d~4 d 换液传代一次,以维持其耐药性。在细胞使用前 2 周,停止加入含 DNR 的培养基。设对照组(CON 组),DNR 组,微残清颗粒含药血清组(WCQ 组),DNR+微残清颗粒含药血清组(DNR+WCQ 组)。CON 组采用对

照组兔血清,DNR 组采用对照组兔血清并予 DNR 干预,WCQ 颗粒组采用含药兔血清,DNR+WCQ 组采用含药兔血清并予 DNR 干预。对照组兔血清、含药兔血清处理细胞时的终体积浓度均为 20%。

### 1.2.3 免疫磁珠法(MACS)分选 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>LSCs 细胞亚群

离心收集待分选细胞,洗涤,按照 1×10<sup>9</sup> 个细胞 200 μL PBS 悬起。按照 1×10<sup>8</sup> 个细胞 20 μL 的比例加入 CD34 磁珠,冰上震荡孵育 15 min。然后加入 5 mL PBS 离心洗涤(400 g,5 min,室温),按照 10<sup>9</sup> 个细胞/mL PBS 悬起细胞,将细胞悬液加入 LS 柱子,然后用 5 mL PBS 洗涤 3 次。取出分离器用 2 mL PBS 吹打出所要细胞并悬起。采用同样方法分选 CD38<sup>-</sup>细胞。收集分选的细胞后流式细胞仪检测,备用。

### 1.2.4 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率

取待检测细胞以 1×10<sup>5</sup> 个/mL 浓度接种于 96 孔培养板,各组培养 24 h 后分别加入 DNR(终浓度为 1.25 μg/mL),含药兔血清(20 μL),含药兔血清 20 μL + DNR(终浓度为 1.25 μg/mL),空白组加入等量对照兔血清,所有反应孔终体积为 200 μL,余用 RPMI-1640 补齐,各组设 5 个复孔。常规培养 24 h、48 h、72 h 后,采用 CCK8 试剂盒进行抑制率检测。根据公式计算细胞增长率及 48 h 时 IC<sub>50</sub> 值。细胞增生抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。

### 1.2.5 siRNA 沉默 PTEN 基因

将对数生长期 KG1a 细胞分为 3 组分别接种到 6 孔培养板中,阴性组转染非特异性 siRNA,阳性组转染特异性干扰 PTEN 表达的 siRNA,同时设空白对照组。严格按照 Lipofectamine TM2000 siRNA 试剂盒说明书进行转染,24 h 后进行 mRNA 及蛋白测定后备用。

### 1.2.6 细胞周期及凋亡检测

作用 KG1a 细胞 72 h 后收集各组细胞离心 5 min,PBS 洗 2 次,计算各组细胞浓度后用 PBS 稀释至 5×10<sup>5</sup> 个/mL,然后加入 2 mL 体积百分数 70% 乙醇(-20℃)固定,培养箱中静置 24 h(4℃),然后各组加入 1 ml AnnexinV FITC/PI(50 μg/mL)后,通过流式细胞仪检测细胞周期及凋亡。

### 1.2.7 RT-PCR 检测 PTEN、PI3K、AKT、mTOR 的 mRNA 表达

选取 72 h 时的各组细胞, Trizol 法分别提取各组细胞总 RNA 后逆转录为 cDNA 备用。然后严格按照说明书步骤进行 RT-PCR 反应, 各组分别设 3 个平行组。按照如下公式计算  $\Delta\Delta Ct$  值:  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照组}$ 。引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PI3K	AACT CTGG GGAT GACC TGGA AGGC GGTC ACAA CACT CCTA	112
AKT	AGGG TTGG CTGC ACCG CG GTTG TTGA AGAG ACAC CGCG	96
mTOR	TTGA GGTT GCTA TGAC CAGA GAGA A TTAC CAGA AAGG ACAC CAGC CAAT G	87
$\beta$ -actin	ACCC CCAC TGAA AAAG ATGA ATCT TCAA ACC TCCA TGAT G	174

### 1.2.8 Western Blot 检测 PTEN、PI3K、p-AKT、p-mTOR 的蛋白表达

作用 KG1a 细胞 72 h 后收集各组细胞, 将待检测同组细胞混匀, PBS 洗涤后加入 200  $\mu$ L 蛋白裂解液, 震荡仪冰上震荡裂解 40 min, 离心 (800 g, 4  $^{\circ}$ C) 后取总蛋白。使用 BCA 法测定蛋白浓度, 常规煮沸离心后采用 SDS-PAGE 法进行蛋白测定, 过程严格按照说明书进行 PTEN、PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白测定。胶带上应用 Bio-Rad ChemiDoc MP 荧光成像系统拍照后 Image Lab 4.0 软件分析, 设定空白组相对定量值为 1, 分析各组的相对蛋白含量值。

### 1.2.9 统计分析方法

采用 SPSS22.0、GraphPad Prism 8 进行数据统计及绘图。计量资料采用两组均数的独立样本 t 检验, 以均数  $\pm$  方差表示, 多组间差异比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。实验均进行 3 次独立实验。

## 2 实验结果

### 2.1 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>LSCs 细胞亚群分选及 IC<sub>50</sub> 值

如图 1 所示, KG1a 细胞在 MACS 分选前 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞亚群占 36.80%  $\pm$  0.25%, 对

DNR 的 IC<sub>50</sub> 值为 (57.48  $\pm$  7.31)  $\mu$ g/mL; 分选后 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞亚群占 94.47%  $\pm$  2.31%, 对 DNR 的 IC<sub>50</sub> 值为 (56.30  $\pm$  13.90)  $\mu$ g/mL, 满足后续实验条件。

### 2.2 微残清颗粒对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a 细胞亚群增殖抑制率的影响

结果显示 (图 2(d)), 在培养 24 h、48 h、72 h 时微残清颗粒组抑制率均最低, DNR<sup>+</sup>微残清颗粒组抑制率均最高, 其中从培养 24 h 后开始 DNR<sup>+</sup>微残清颗粒组抑制率明显均高于 DNR 组、微残清颗粒组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。同时采用 siRNA 沉默 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a 亚群的 PTEN 表达 (图 2(a)、(b)、(c)), 并进行了增殖抑制率的检测。结果显示 (图 2(e)), 在培养 24 h、48 h、72 h 后微残清颗粒组对 (PTEN<sup>-</sup>)CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a 亚群的增殖抑制率均最低, DNR<sup>+</sup>微残清颗粒组未表现出较强的增殖抑制作用。这些结果表明微残清颗粒可能通过 PTEN 靶点增强 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a 细胞亚群对 DNR 的药物敏感性。

### 2.3 微残清颗粒对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a 细胞亚群细胞凋亡及周期的影响

结果显示 (图 3(a)、(b)), 培养 72 h 后微残清颗粒组、DNR<sup>+</sup>微残清颗粒组的 G2/M 期明显高于对照组和 DNR 组, 而对 siRNA 沉默 PTEN 表达后的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a 细胞亚群进行检测显示 (图 3(c)、(d)), 各组的细胞周期未见明显差异。同时我们也检测了各组细胞凋亡情况, 结果显示 (图 4(a)、(b)、(c)、(d)), 培养 72 h 后 DNR<sup>+</sup>微残清颗粒组的细胞总凋亡率明显增高, 与对照组及 DNR 组比较, 微残清颗粒可明显增加细胞的早期凋亡。而对 siRNA 沉默 PTEN 表达的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a 细胞亚群进行检测显示 (图 4(e)、(f)、(g)、(h)), DNR<sup>+</sup>微残清颗粒组的总凋亡率未见提高, 微残清颗粒组的早期凋亡也未见升高。这些结果表明, 微残清颗粒可能通过 PTEN 靶点诱导 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a 细胞亚群进入细胞周期, 进而促进细胞凋亡。

### 2.4 微残清颗粒对 PI3K、AKT、mTOR mRNA 及磷酸化蛋白表达的影响

结果显示 (图 5(a)、(c)、(e)), 在干预 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a 细胞亚群 72 h 后, 与对照

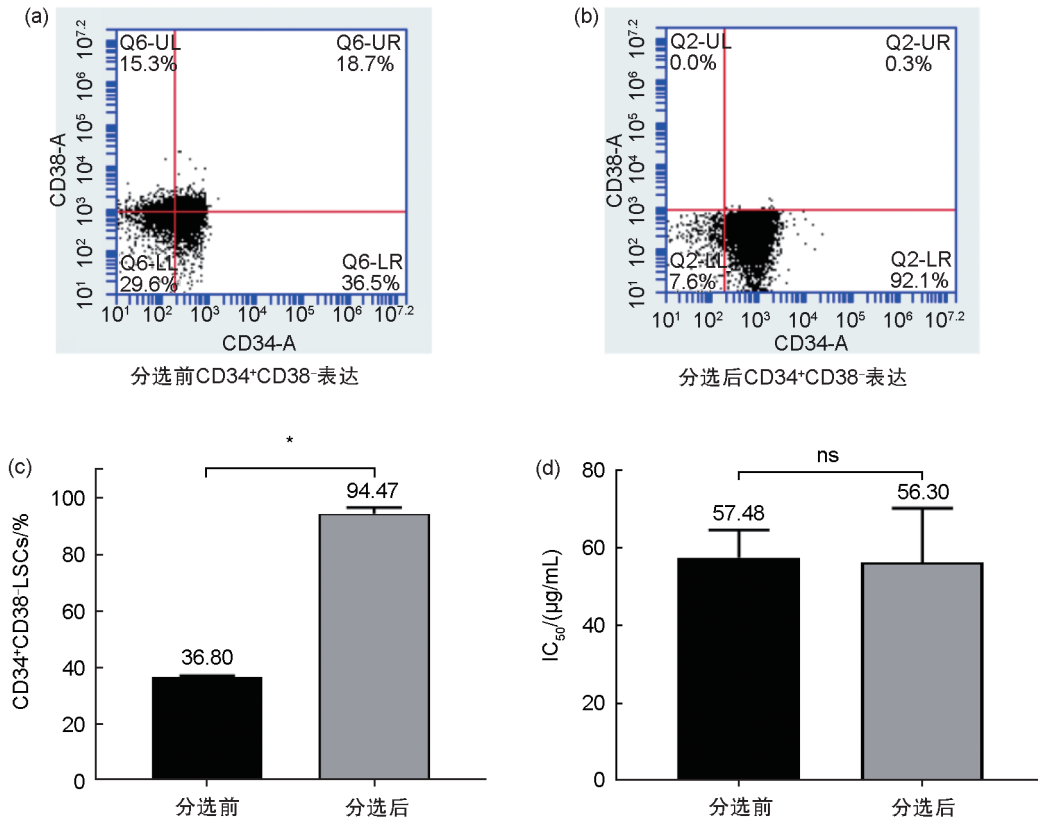


图1 细胞分选前后CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>比例及IC<sub>50</sub>值

(a), (b)流式细胞检测分选前后CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>比例; (c)分选前后CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>比例柱状图; \* $P < 0.05$ ; (d)分选前后CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>对DNR48 h时的IC<sub>50</sub>值, ns代表 $P > 0.05$

Fig. 1 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> ratio and IC<sub>50</sub> value before and after cell sorting

(a), (b) Detection of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> ratio before and after sorting by flow cytometry; (c) CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> proportional histogram before and after sorting; \* $P < 0.05$ ; (d) IC<sub>50</sub> value of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> for DNR48 h before and after sorting

组、DNR组比较,微残清颗粒组和DNR<sup>+</sup>微残清颗粒组的PTEN mRNA及蛋白表达均明显增高,其中DNR<sup>+</sup>微残清颗粒组的PI3K、p-AKT、p-mTOR mRNA及蛋白表达出现不同程度的表达下降;DNR组和WCQ组的PI3K、p-AKT、p-mTOR mRNA及蛋白表达与对照组比较未见差异。而对siRNA沉默PTEN后的CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a细胞亚群进行检测时发现(图5(b)、(d)、(f)),与对照组比较,其余各组的PI3K、p-AKT、p-mTOR mRNA及蛋白表达均未见差异。这些结果表明,微残清颗粒可上调PTEN的表达,但未能调控PI3K/AKT/mTOR通路,而与DNR联用时具有负调控PI3K/AKT/mTOR通路的作用,提示微残清颗粒可能通过靶向PTEN负调控PI3K/AKT/mTOR通路而逆转LSC耐药。

### 3 讨论

现在越来越多的研究证实,LSCs是白血病发生的根源,它们具有类似正常造血干细胞的自我更新、无限增殖和分化特性<sup>[8-9]</sup>。1994年,Lapidot等<sup>[10]</sup>首先发现具有CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>表型的白血病细胞亚群,并证实该群细胞与造血干细胞(Hematopoietic Stem Cell, HSC)一样具有自我更新和增殖的能力。随后Bonnet等<sup>[11]</sup>发现人CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞亚群可导致NOD/SCID小鼠发生人类急性髓性白血病,证实CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞群为LSC,并可致发生白血病。进一步研究发现,LSC具有处于静默期、表达高水平三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)转运蛋白及耐受分化凋亡刺激等特性<sup>[12-15]</sup>,这些特性参与了LSC的耐药残留,最终导致白血病的复发难治。因此,本研究选择经典

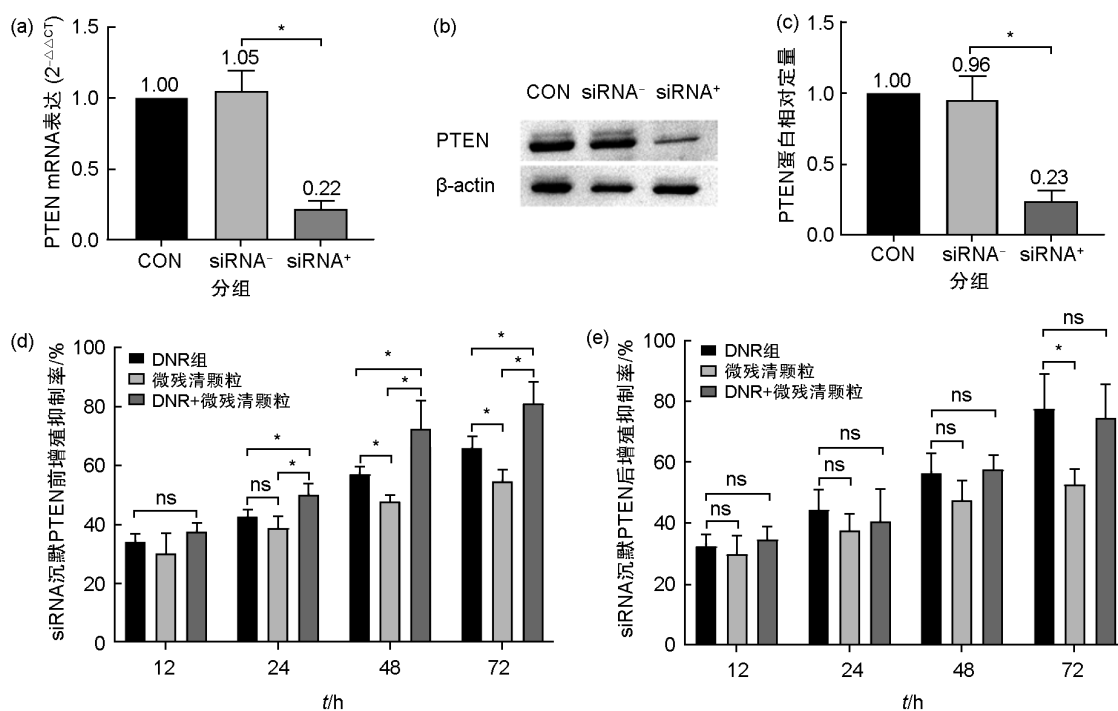


图2 微残清颗粒对CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a细胞亚群增殖抑制率的影响

(a) siRNA 沉默后PTEN mRNA 表达;(b)、(c) siRNA 沉默后PTEN 蛋白的表达;  
(d), (e) siRNAPTEN 沉默前后对DNR 的增殖抑制情况;\*P<0.05, ns 代表P>0.05

Fig. 2 Effect of WeiCanQing Granule on the proliferation inhibition rate of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a cell subgroup

(a) PTEN mRNA expression after siRNA silencing; (b), (c) Expression of PTEN protein after siRNA silencing; (d), (e) Inhibition of DNR proliferation before and after sirNAPTEN silencing; \*P<0.05

CD34、CD38 抗原,采用免疫磁珠法分选LSCS 亚群,分选后 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞亚群占 94.47% ±2.31%,对 DNR 的 IC<sub>50</sub> 值为 (56.30±13.90) μg/mL,具有较好耐药性和白血病细胞干性。

近年研究发现 PTEN 通过多种细胞信号通路参与肿瘤细胞的生长、分化及转移,是一个可以广泛参与肿瘤细胞各阶段进程的负性调控基因。越来越多的研究证实,PTEN 基因的缺失、突变或低表达与包括白血病在内的多种肿瘤的不良预后或耐药、复发密切相关<sup>[16]</sup>。而 PTEN 的下游信号通路 PI3K-Akt-mTOR 更是参与多种肿瘤的发生,被刺激因子活化的 PI3K 能产生 PIP3,并进一步促使下游 Akt 蛋白发生磷酸化,p-Akt 激活进一步激活下游 mTOR 并使之发生磷酸化,进而调控下游靶点的转录和表达,并最终抑制细胞凋亡。本研究显示,微残清颗粒含药血清可提高 PTEN 的 mRNA 及蛋白的表达量,进而负调控 PI3K/Akt/mTOR 通路的表达。

根据复发白血病“髓虚邪伏,邪毒致变”的发病机制,笔者在多年临床实践中总结出

益气养阴解毒法治疗复发难治白血病,该治法的代表方微残清颗粒在临床中具有较好的疗效<sup>[17-18]</sup>。微残清颗粒由当归补血汤、青黄散及四君子汤加减组成,具有益气养阴解毒的功效,方中以黄芪、当归为君凑益气养血之功,青黛、雄黄、全蝎为臣凑解毒祛邪之功,人参、茯苓、白术、甘草为佐使凑益气健脾之功,全方攻补兼施,祛邪不伤正,扶正不留邪。前期研究发现,微残清颗粒可以调控复发难治白血病患者骨髓细胞周期与凋亡,抑制骨髓细胞 P-gp 表达,进而提高化疗药物敏感性。而其拆方中的全蝎提取物可抑制 LSCs 在模拟 Niche 中的迁移率<sup>[19]</sup>,具有下调 LSCs 细胞膜上 P-gp,细胞质 ALDH、PI3K 及细胞核中 mTOR 的表达水平,从而干预 K562 白血病干细胞的增殖和抗耐药<sup>[20]</sup>。本研究以 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a 细胞亚群为 LSCs,结果表明微残清颗粒含药血清可协同 DNR 提高对 LSCs 的抑制率,诱导 LSCs 进入细胞周期 G2/M 期,促进 LSCs 的总凋亡和早期凋亡。

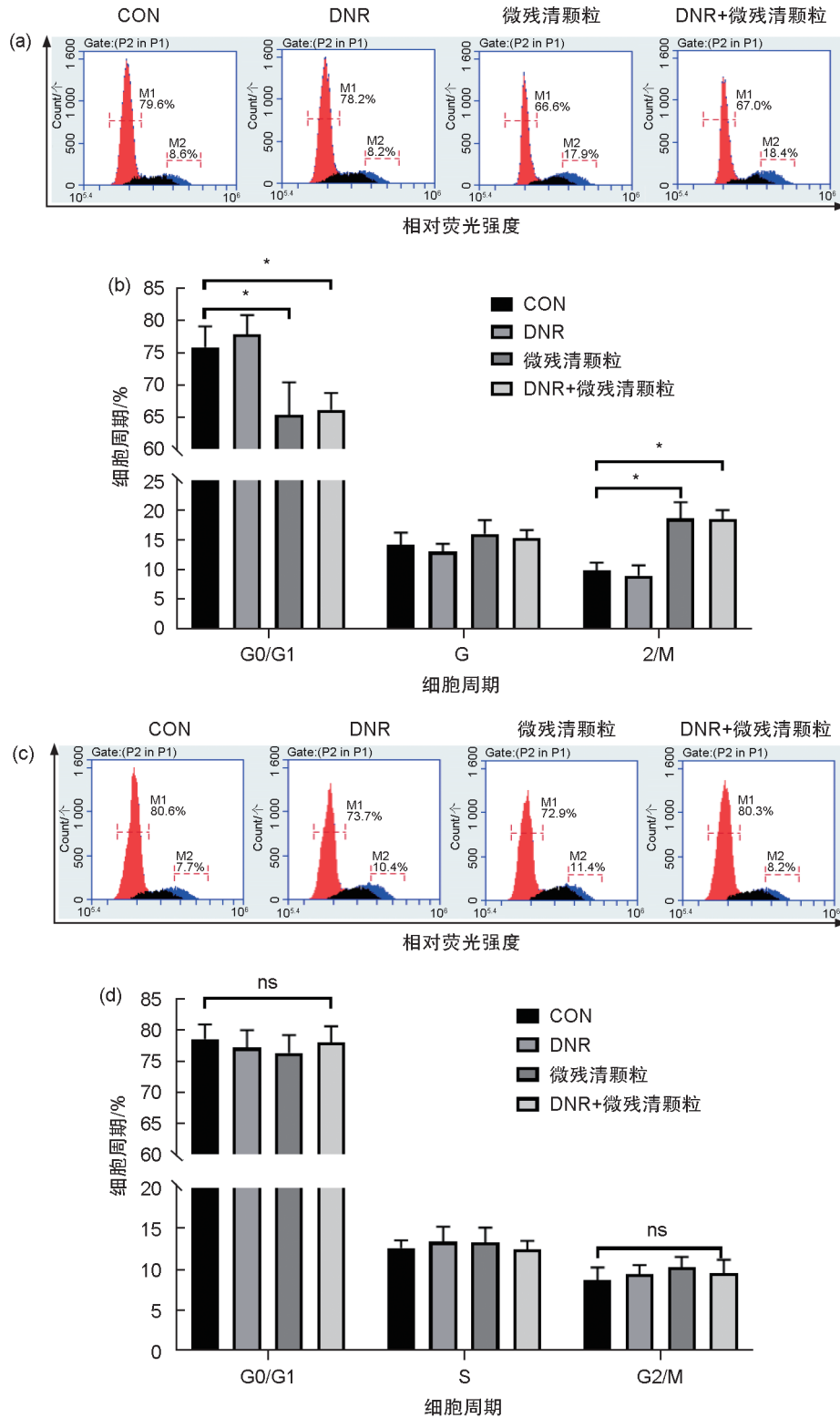


图3 微残清颗粒对CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a细胞亚群细胞周期的影响

(a), (b) 流式细胞检测 siRNA 沉默PTEN前CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a细胞亚群的细胞周期比例; (c), (d) 流式细胞检测 siRNA 沉默PTEN后CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a细胞亚群的细胞周期比例; \*P<0.05, ns代表P>0.05

Fig. 3 Effect of WeiCanQing granule on cell cycle of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a cell subgroup

(a), (b) Cell cycle proportion of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a cell subpopulation before PTEN silenced by siRNA was detected by flow cytometry; (c), (d) Detection of cell cycle proportion of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a cell subgroup after silencing PTEN by siRNA by flow cytometry; \*P<0.05

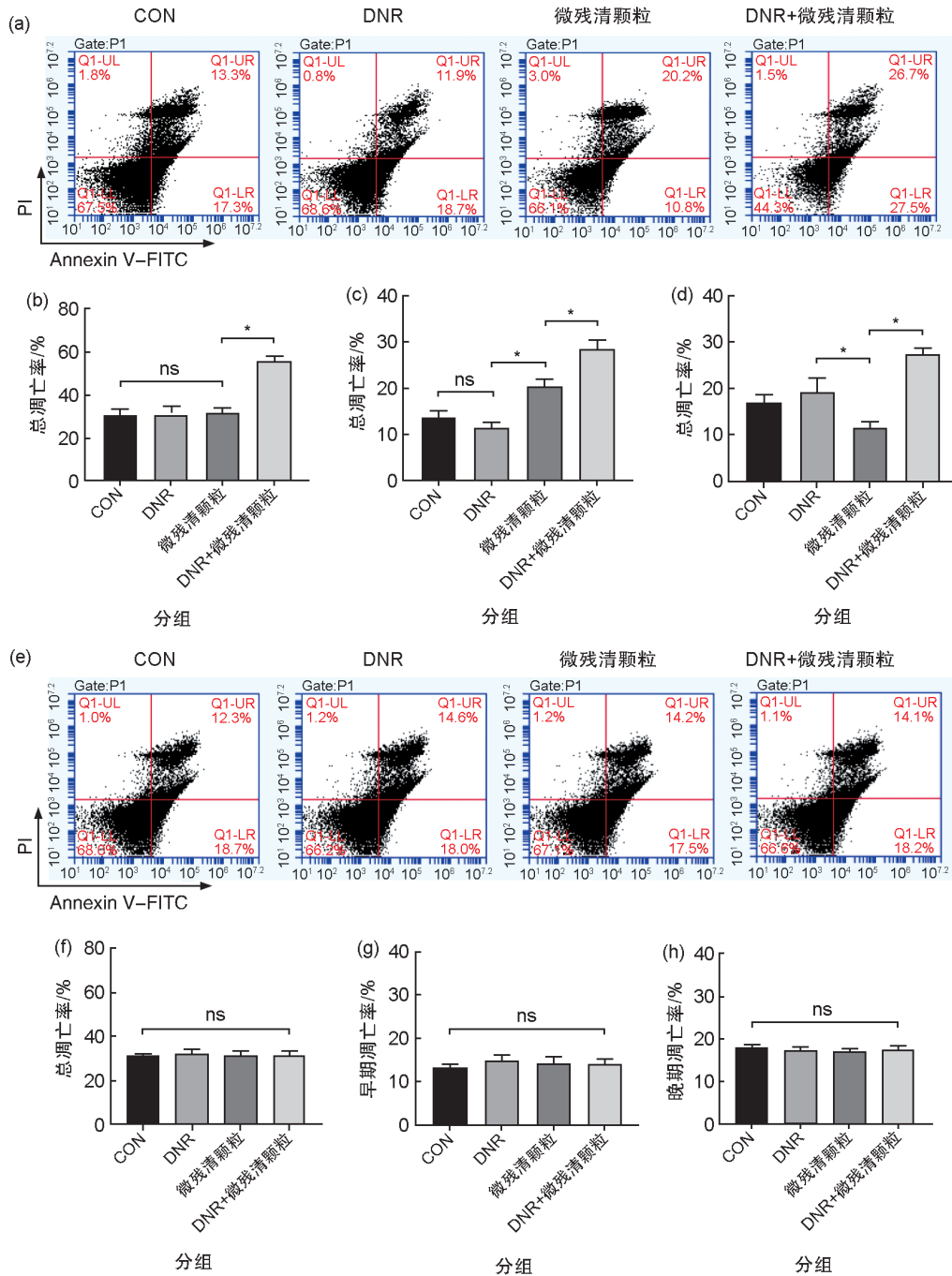


图4 微残清颗粒对CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a细胞亚群细胞凋亡的影响

(a), (b), (c), (d)流式细胞检测siRNA沉默PTEN前各组细胞凋亡情况;(e), (f), (g), (h)流式细胞检测siRNA沉默PTEN后各组细胞凋亡情况;\*P<0.05, ns代表P>0.05

Fig. 4 Effect of WeiCanQing Granule on apoptosis of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG1a cell subgroup

(a), (b), (c), (d) Flow cytometry was used to detect the apoptosis of cells in each group before siRNA silencing PTEN; (e), (f), (g), (h) Flow cytometry was used to detect the apoptosis of cells in each group after siRNA silencing PTEN; \*P<0.05

在对PI3K/AKT/mTOR通路关键基因及磷酸化蛋白检测时发现,微残清颗粒含药血清可协同DNR可提高LSCs亚群PTEN mRNA及蛋白表达,降低PI3K、AKT、mTOR mRNA及磷酸化蛋白表达。而在采用siRNA沉默PTEN后,微

残清颗粒含药血清却不具备上述调控作用。因此,我们认为微残清颗粒含药血清具有调控LSCs增殖、细胞周期及凋亡的作用,并且对PI3K/AKT/mTOR信号通路关键因子具有调控作用。

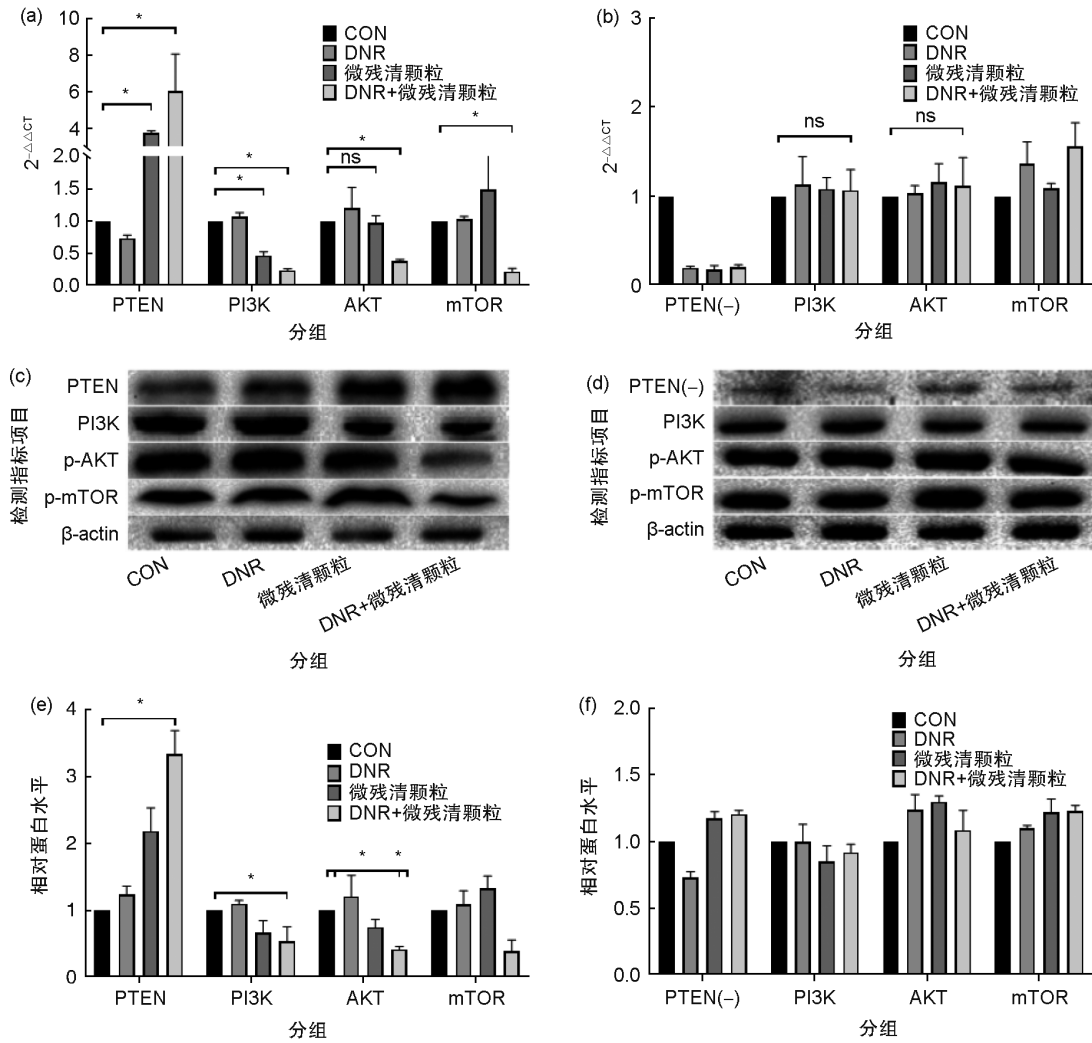


图5 微残清颗粒对PI3K、p-AKT、p-mTOR mRNA及蛋白表达的影响

(a), (b) RT-PCR检测siRNA沉默PTEN前后各组PTEN、PI3K、AKT、mTOR mRNA表达情况; \* $P < 0.05$ , ns代表 $P > 0.05$ ; (c), (d), (e), (f) Western印迹检测siRNA沉默PTEN前后各组PTEN、PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达情况

Fig. 5 Effect of WeiCanQing granule on PI3K, p-AKT, p-mTOR mRNA and protein expression

(a), (b) RT-PCR was used to detect the expression of PTEN, PI3K, AKT and mTOR mRNA in each group before and after silencing PTEN by siRNA; \* $P < 0.05$ ; (c), (d), (e), (f) Western blot was used to detect the expression of PTEN, PI3K, p-AKT, p-mTOR protein in each group before and after silencing PTEN by siRNA

综上,本研究以CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>KG1a细胞亚群为对象,通过体外实验发现微残清颗粒具有逆转LSCs对DNR耐药的作用,其机制可能是通过上调PTEN的表达,进而负调控PI3K/AKT/mTOR通路发挥逆转耐药作用。微残清颗粒可应用于复发难治白血病的辅助治疗。

参考文献:

[1] SIEGELI RL, MILLER KD, FUCHA HE, et al. Cancer statistics, 2020[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33. DOI:10.3322/caac.21590.  
 [2] VETRIE D, HELGASON G V, COPLAND M. The Leu-

kaemia Stem Cell: Similarities, Differences and Clinical Prospects in CML and AML[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(3): 158-173. DOI: 10.1038/s41568-019-0230-9.  
 [3] 中国中西医结合学会血液专业委员会. 老年急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病APL)中西医结合诊疗专家共识[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(4): 405-411. DOI:10.7661/j.cjim.20190318.167.  
 Specialty Committee of Hematology of Chinese Association of Integrative Medicine. Expert Consensus on Diagnosis and Treatment of Elderly Acute Myeloid Leukemia(Non-Acute Promyelocytic Leukemia) with Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2019, 39(4): 405-411. DOI:10.7661/j.cjim.20190318.167.

- [4] 史哲新, 王秀婷, 闫理想, 等. 中西医个体化分层治疗老年急性髓系白血病回顾性分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, **37**(9): 1069-1072. DOI: 10.7661/j.cjim.20170626.163.  
SHI Z X, WANG X T, YAN L X, *et al.* Retrospective Analysis of Individualized Stratified Treatment of Elderly Acute Myeloid Leukemia with Traditional Chinese and Western Medicine[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2017, **37**(9): 1069-1072. DOI: 10.7661/j.cjim.20170626.163.
- [5] 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. DOI: 10.11656/j.issn.1672-1519.2023.03.01  
YAN L X, JIANG J, YANG X D, *et al.* Clinical Observation of Weicanqing Granule in Reversing Drug Resistance of Recurrent/Refractory Acute Myeloid Leukemia (non-APL) [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2023, **40**(3): 273-280. DOI: 10.11656/j.issn.1672-1519.2023.03.01.
- [6] 闫理想, 姜静, 杨向东, 等. 微残清颗粒含药血清对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>KG1a 细胞增殖凋亡的影响及其作用机制[J]. 山东医药, 2022, **62**(30): 1-5. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2022.30.001  
YAN L X, JIANG J, YANG X D, *et al.* Effect of Serum Containing Weicanqing Granule on Proliferation and Apoptosis of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>KG1a Cells and Its Mechanism [J]. *Shandong Med J*, 2022, **62**(30): 1-5. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2022.30.001.
- [7] SHI Z X, LI H Y, YANG X D, *et al.* Yi-Qi-Yang-Yin-Tang Increases the Sensitivity of KG1a Leukemia Stem Cells to Daunorubicin by Promoting Cell Cycle Progression and Regulating the Expression of PTEN, TOP2 and mTOR[J]. *Oncol Lett*, 2017, **14**(6) : 6441-6448. DOI: 10.3892/ol.2017.7067.
- [8] THOMAS D, MAJETI R. Biology and Relevance of Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells[J]. *Blood*, 2017, **129** (12): 1577-1585. DOI:10.1182/blood-2016-10-696054.
- [9] SUDA T, TAKUBO K, SEMENZA G L. Metabolic Regulation of Hematopoietic Stem Cells in the Hypoxic Niche[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, **9**(4): 298-310. DOI: 10.1016/j.stem.2011.09.010.
- [10] LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J, *et al.* A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia After Transplantation Into Scid Mice[J]. *Nature*, 1994, **367** (6464):645-648. DOI:10.1038/367645a0.
- [11] BONNET D, DICK J E. Human Acute Myeloid Leukemia is Organized as A Hierarchy that Originates from A Primitive Hematopoietic Cell[J]. *Nat Med*, 1997, **3**(7): 730-737. DOI:10.1038/nm0797-730.
- [12] TAKUBO K, SUDA T. Roles of the Hypoxia Response System in Hematopoietic and Leukemic Stem Cells[J]. *Int J Hematol*, 2012, **95**(5): 478-483. DOI: 10.1007/s12185-012-1071-4.
- [13] MILISAV I, POLJŠAK B, RIBARIČ S. Reduced Risk of Apoptosis: Mechanisms of Stress Responses[J]. *Apoptosis*, 2017, **22**(2): 265-283. DOI: 10.1007/s10495-016-1317-3.
- [14] LEE J Y, JUN D Y, KIM K Y, *et al.* Pharmacologic Inhibition of Autophagy Sensitizes Human Acute Leukemia Jurkat T Cells to Acacetin-induced Apoptosis[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, **27**(1): 197-205. DOI: 10.4014/jmb.1610.10055.
- [15] ALI SHAH S Z, ZHAO D M, HUSSAIN T, *et al.* Role of the AMPK Pathway in Promoting Autophagic Flux via Modulating Mitochondrial Dynamics in Neurodegenerative Diseases: Insight into Prion Diseases[J]. *Ageing Res Rev*, 2017, **40**: 51-63. DOI: 10.1016/j.arr.2017.09.004.
- [16] 孙巨勇, 牟娜, 牟佳, 等. PTEN 及 BCL-2 在急性髓系白血病中的表达及意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2018, **26** (1)121-125. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2018.01.020.  
SUN J Y, MU N, MU J, *et al.* Expression and Significance of PTEN and BCL-2 in Acute Myeloid Leukemia[J]. *J Exp Hematol*, 2018, **26**(1)121-125. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2018.01.020.
- [17] 史哲新, 杨文华, 高宏, 等. 中西医结合治疗难治性白血病临床观察[J]. 新中医, 2011, **43**(1): 95-96.  
SHI Z X, YANG W H, GAO H, *et al.* Clinical Observation on Treatment of Refractory Leukemia with Combination of Traditional Chinese and Western Medicine[J]. *China Ind Econ*, 2011, **43**(1): 95-96.
- [18] 闫理想, 史哲新, 姜静, 等. 益气养阴方逆转难治性急性白血病多药耐药临床观察[J]. 北京中医药大学学报, 2015, **38**(1): 68-72. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2015.01.015.  
YAN L X, SHI Z X, JIANG J, *et al.* Clinical Observation of Replenishing Qi and Nourishing Yin Formula Reversing Multidrug Resistance of Patients with Refractory Acute Leukemia[J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2015, **38**(1): 68-72. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2015.01.015.
- [19] 杨向东, 史哲新, 姚芳, 等. 蝎毒多肽对白血病干细胞 MDR1 mRNA 和 P-gp 表达的影响[J]. 中医药学报, 2016, **44**(1): 36-40.  
YANG X D, SHI Z X, YAO F, *et al.* Effect of PESV on Expression Levels of MDR1mRNA and P-GP in Leukemic Stem Cells[J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2016, **44**(1): 36-40.
- [20] 杨向东, 史哲新, 闫理想, 等. 从白血病干细胞水平研究蝎毒多肽提取物逆转多药耐药机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, **36**(7): 867-874. DOI: 10.7661/CJIM.2016.07.0867.  
YANG X D, SHI Z X, YAN L X, *et al.* Study on the Mechanism of Reversal of Multidrug Resistance by Scorpion Venom Polypeptide Extract from Leukemia Stem Cell Level[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2016, **36**(7): 867-874. DOI: 10.7661/CJIM.2016.07.0867.