

PLSCR1 在苦参碱逆转 APL 细胞维甲酸耐药中的意义

吴迪炯¹ 刘婷婷^{1△} 周琦浩¹ 孙 洁² 邵科钉¹ 叶宝东¹ 周郁鸿¹

摘要 目的 观察磷脂爬行酶 1 (phospholipid scramblase 1, PLSCR1) 在苦参碱 (matrine, MAT) 诱导维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 耐药急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 细胞分化的表达, 并探讨其与环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)/蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 途径的相关性。**方法** 以 ATRA 敏感的 APL 细胞系 NB4 以及 ATRA 耐药株 NB4-R1 为研究对象。通过 NBT 还原实验以及流式细胞仪 (CD11b) 检测 0.1 mmol/L MAT 联合 1 μ mol/L ATRA 对两细胞株分化标记的影响; 采用 Western blot、实时荧光定量 PCR 技术测定细胞 PML/RAR α 、PLSCR1 蛋白及基因表达; 同时应用 PKA 拮抗剂 H89 联合作用, 观察细胞分化抗原及上述蛋白/基因表达的变化。**结果** MAT 联用 ATRA 能明显提高 NB4-R1 细胞 NBT 及 CD11b 阳性率, 并显著下调 PML/RAR α 融合蛋白/基因的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。单用 ATRA 能使 NB4 细胞 PLSCR1 在蛋白及 mRNA 水平表达均得到明显增强 ($P < 0.01$), 而在 NB4-R1 细胞内同样表达上调, 但仅蛋白水平差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。在联用 MAT 后, 两细胞株 PLSCR1 蛋白表达进一步上升 ($P < 0.01$), 并且 NB4-R1 细胞 mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。上述作用均能被 10 μ mol/L H89 逆转 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** MAT 联合 ATRA 能显著诱导 NB4-R1 细胞获得再分化, 同时抑制 PML/RAR α 融合基因/蛋白的表达, 这可能与上调 PLSCR1 表达有关。

关键词 磷脂爬行酶 1; 蛋白激酶 A 拮抗剂; 苦参碱; 急性早幼粒细胞白血病; 维甲酸耐药

Significance of PLSCR1 in Matrine Induced Differentiation of ATRA Resistant APL Cells WU Di-jiong¹, LIU Ting-ting¹, ZHOU Qi-hao¹, SUN Jie², SHAO Ke-ding¹, YE Bao-dong¹, and ZHOU Yu-hong¹ 1 Department of Hematology, First Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 2 Department of Bone Marrow Transplantation, First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou (310006)

ABSTRACT Objective To observe the expression of phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) in matrine (MAT) induced differentiation of all-trans retinoic acid (ATRA) resistant acute promyelocytic leukemia (APL) cells, and to explore its correlation to cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) signal pathway. **Methods** NB4 (an APL cell line sensitive to ATRA) and NB4-R1 (a resistant strain of ATRA) were observed as subjects in this study. Effects of combined treatment of 0.1 mmol/L MAT and 1 μ mol/L ATRA on the differentiation of two cell lines were detected using nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test and flow cytometry (CD11b). Expressions of PML/RAR α and PLSCR1 protein/gene were detected using Western blot and Real-time fluorescence quantitative PCR assay. Meanwhile, H89, PKA antagonist, was used to observe cell differentiation antigen and changes of aforesaid proteins and genes. **Results** MAT combined ATRA could significantly elevate positive rates of NBT and CD11b in NB4-R1 cells, and significantly down-regulate the expression of PML/RAR α fusion protein/gene

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81503296); 浙江省自然科学基金资助项目 (No.Y2101416, No.Y14H290012); 浙江省中医药优秀青年人才基金计划 (No.2013ZQ012); 浙江省教育厅科研计划项目 (No.Y201223638)

作者单位: 1. 浙江中医药大学第一临床医学院血液科 (杭州 310053); 2. 浙江大学附属第一医院骨髓移植中心 (杭州 310006)

通讯作者: 周郁鸿, Tel: 0571-86620325, E-mail: zyhblood@163.com

△现在湖北省武汉市中医医院内科 (武汉 430010)

DOI: 10.7661/CJIM.2015.11.1345

($P < 0.05$, $P < 0.01$). ATRA used alone could obviously enhance the expression of PLSCR1 in NB4 cells at protein and mRNA levels ($P < 0.01$). But the expression of PLSCR1 was up-regulated in NB4-R1 cells, but with statistical difference only at the protein level ($P < 0.01$). In combination of MAT, PLSCR1 protein expression was further elevated in the two cell lines ($P < 0.01$). Besides, there was statistical difference in mRNA expressions in NB4-R1 cells ($P < 0.05$). All these actions could be reversed by treatment of 10 $\mu\text{mol/L}$ H89 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion MAT combined ATRA could significantly induce the differentiation of NB4-R1 cells, and inhibit the expression of PML/RAR α fusion gene/protein, which might be associated with up-regulating PLSCR1 expression.

KEYWORDS phospholipid scramblase 1; protein kinase A antagonist; matrine; acute promyelocytic leukemia; retinoic acid resistant

在国内,急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)约占同期白血病的 3.3% ~ 21.2%^[1]。尽管全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)诱导分化疗法可使其完全缓解(CR)率达 85%以上,但快速发展的耐药与高复发率仍是影响长期疗效的两大障碍,文献报道 10 年的累积复发率接近 33%^[2]。苦参碱(Matrine, MAT)是中药苦参的有效生物碱成分,具有解热镇痛、抗炎、抗病毒、抗心律失常等多种作用,临床上已多年用于慢性肝病的治疗^[3]。本课题组前期研究表明,低毒性浓度(0.1 mmol/L)MAT 联合 ATRA 能在体外显著诱导 ATRA 耐药 APL 细胞(NB4-R1)的再分化过程,具体的机制尚未阐明,可能与上调环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)/蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)水平有关^[4-6]。本研究将进一步探讨钙信号途径相关的磷脂爬行酶 1(phospholipid scramblase 1, PLSCR1)在 MAT 诱导耐药细胞分化的表达,并探讨其与 cAMP/PKA 途径的相关性。

材料和方法

1 细胞株 APL ATRA 不耐药细胞株 NB4 及 APL ATRA 耐药株 NB4-R1,均由上海交通大学附属瑞金医院血液病研究所馈赠。

2 药物 MAT(纯度 98%,泽朗医药科技有限公司,批号:ZL1210175),溶于 PBS 配成 0.1 mmol/L 作用浓度;ATRA(美国 Sigma 公司),溶于 DMSO 配成 1 $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度。

3 主要试剂及仪器 硝基四唑氮蓝(nitroblue tetrazolium, NBT, 美国 Sigma 公司,批号:24897795);PKA 拮抗剂 H89(美国 Calbiochem 公司,批号:24278256);CD11b 流式抗体(美国 Biolegend 公司,批号:F0235L);PML 单克隆抗体(美国

Santa Cruz 公司,批号:V2732);PLSCR1 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号:C0811);RNA 逆转录试剂盒(中国大连 TaKaRa 公司,批号:AK6501);荧光定量 RT-PCR 试剂盒(中国大连 TaKaRa 公司,批号:AK3001)。光学显微镜(型号:Leica DME,上海徕卡显微系统有限公司),DNA/RNA 浓度测定仪(型号:NANODROP ND-2000,美国 Thermo 公司),反转录仪(型号:PCT-200,美国 Bio-RAD 公司),荧光定量 PCR 仪(型号:480 II,美国 Bio-RAD 公司),流式细胞仪(型号:FC500MCL,美国 Beckman 公司)。

4 方法

4.1 细胞培养 细胞以初始浓度 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于含 20%胎牛血清的 1640 培养基,至对数生长期用药物作用,并在共孵育 72 h 后收集细胞。

4.2 PKA 拮抗剂 H89 作用浓度的选择 将 NB4 细胞株根据不同药物处理方式分别为 6 组:空白对照组;ATRA(1 $\mu\text{mol/L}$)组;以及 ATRA(1 $\mu\text{mol/L}$)加 H89 组(H89 提前孵育 1 h),H89 浓度分别为 5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 。通过检测各组细胞 CD11b 分化抗原以及 PLSCR1 表达水平确定合适的 H89 作用浓度。

4.3 细胞分化能力 采用 NBT 还原实验测定。根据不同药物处理方式,将 NB4、NB4-R1 细胞分为 5 组,即:空白对照组、ATRA 组、MAT、ATRA 加 MAT 组以及 ATRA 加 MAT 加 H89 组。ATRA 作用浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$,MAT 作用浓度为 0.1 mmol/L,H89 提前孵育 1 h(最终筛选出的作用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)。共培养 72 h 后,取各组细胞分别用 PBS 洗涤 2 次,800 r/min,离心 8 min,计数并调节细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,每组设置 3 个复孔。用含 1 $\mu\text{g/mL}$ TPA 和 1 mg/mL NBT 的 RPMI 1640 培养基混合液 100 μL 作用 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min,离心 5 min,弃

掉上清液。取每孔细胞分别涂片,光学显微镜下观察 NBT 阳性细胞(细胞内存在蓝色月牙状沉积物),计数 400 个细胞,计算 NBT 还原阳性细胞率。NBT 还原阳性细胞率(%) = NBT 阳性细胞数(个)/400 个 × 100%。

4.4 细胞表面分化抗原表达变化 采用流式细胞仪检测。按 4.3 进行实验分组,加药培养 72 h 后,取各组细胞分别用 PBS 洗涤 2 次,800 r/min,离心 8 min,各加入 5 μL 鼠抗人 CD11b,另单用未处理的空白对照组细胞加入 5 μL PE 流式抗体同型对照,混匀后 4 ℃ 孵育 30 min。PBS 洗涤 2 次,洗除未结合的抗体。将细胞悬浮于 0.5 mL PBS 中,流式细胞仪检测 CD11b 的阳性表达率。

4.5 PML/RARα、PLSCR1 蛋白表达水平 采用 Western blot 检测。提取细胞总蛋白,经 Bradford 法定量蛋白,按 200 μg 总蛋白量上样,经 SDS-PAGE 电泳后,转移到硝酸纤维膜上,100 g/L 脱脂奶粉 4 ℃ 封闭过夜,室温下与 PML、PLSCR1 单抗反应 2 h。辣根过氧化物酶标记的二抗反应 1 h,充分洗膜后化学增强发光。

4.6 PML/RARα、PLSCR1 基因表达 采用实时荧光定量 PCR 检测。常规提取细胞总 mRNA (Trizol 一步法),进行逆转录,将反应后 cDNA 产物 PCR 反应体系中进行目标片段的扩增(引物序列见表 1)。操作按照试剂盒。启动 PCR 仪,设定程序,95 ℃ 30 s 预变性,95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s,共计 40 个循环反应。反应结束后得到扩增曲线和溶解曲线,采用相对定量方法分析各样本的 ΔCt 值(ΔCt = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值),再依据 ΔΔCt 值 = 实验组 ΔCt 值 - 对照组 ΔCt 值,计算 2^{-ΔΔCt} 的值。

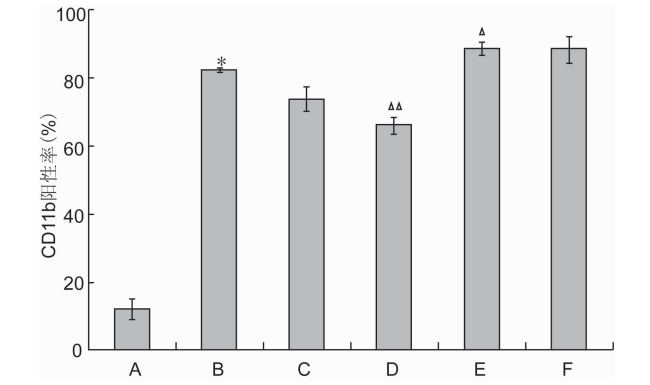
表 1 PML/RARα、PLSCR1 基因实时荧光定量 PCR 检测引物序列		
基因名称	引物序列	扩增长度
PML/RARα	F: 5'-GAAGACCTGGTGCCTATGA-3'	339 bp
	R: 5'-CTCTGGAGCTCCGTGAAGTT-3'	
PLSCR1	F: 5'-CTGACTTCTGAGAAGGTTC-3'	29.7 kD
	R: 5'-GAATGCTGTGCGGTGATACT-3'	
β-actin	F: 5'-GTCACCAACTGGGACGACATG-3'	674 bp
	R: 5'-GACAGCACTGTGTTGCGGTACA-3'	

4.7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。先进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用中位数(四分位间距)表示;多组间比较采用方差分析,并采用

SNK 作两两比较;方差不齐采用非参数检验,多组间比较用 *Kruskal-Wallis H* 检验,两两比较用 *Mann-Whitney U* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度 PKA 拮抗剂 H89 对 NB4 细胞 CD11b 及 PLSCR1 表达的影响(图 1、2) NB4 细胞在 ATRA 作用后 CD11b 表达水平明显提高(*P* < 0.01)。H89 对细胞 CD11b 的表达的影响与作用浓度有关:H89 在 5、10 μmol/L 时抑制细胞分化,并在 10 μmol/L 时差异有统计学意义(*P* < 0.01);在 15、20 μmol/L 时反而促进细胞分化,在 15 μmol/L 时差异亦有统计学意义(*P* < 0.05)。PLSCR1 在 NB4 细胞的初始表达水平较低,ATRA 作用后明显上调。H89 联合作用后,细胞内 PLSCR1 均明显下降,并且在 10 μmol/L 时表达水平最低,随着 H89 浓度升高,PLSCR1 表达增高。故选择 H89 在 10 μmol/L 时作为后续实验浓度。



注:A 为空白对照组;B 为 ATRA 组;C 为 ATRA 加 H89 (5 μmol/L)组;D 为 ATRA 加 H89 (10 μmol/L)组;E 为 ATRA 加 H89 (15 μmol/L)组;F 为 ATRA 加 H89 (20 μmol/L)组;与 A 组比较,**P* < 0.01;与 ATRA 组比较,Δ*P* < 0.05, ΔΔ*P* < 0.01

图 1 H89 对 NB4 细胞株 CD11b 表达的影响

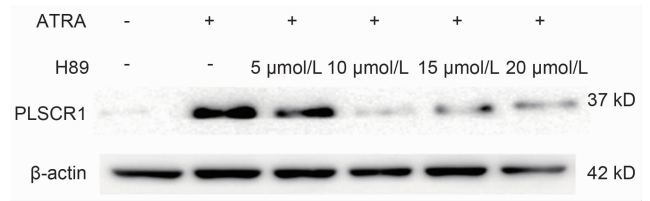
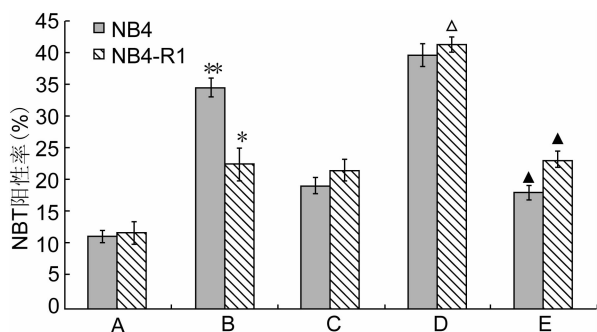


图 2 H89 对 NB4 细胞株 PLSCR1 表达的影响

2 MAT 对 NB4、NB4-R1 细胞 NBT 阳性率的影响及 H89 的拮抗作用(图 3) NB4 和 NB4-R1 的初始 NBT 阳性率(%) 相近,分别为 11.3 ± 1.5 和

12.0 ± 3.0。ATRA 作用后,两细胞株 NBT 阳性率均增高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。单用 MAT 能一定程度上提高 NBT 阳性率,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。ATRA 联合 MAT 能提高 NB4-R1 细胞 NBT 阳性率($P < 0.05$)。在 H9 作用后,均能明显减少两细胞株 NBT 阳性率($P < 0.01$)。



注:A 为空白对照组;B 为 ATRA 组;C 为 MAT 组;D 为 ATRA 加 MAT 组;E 为 ATRA 加 MAT 加 H9 组;与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ATRA 组比较, Δ $P < 0.05$; 与 ATRA 加 MAT 组比较, ▲ $P < 0.01$

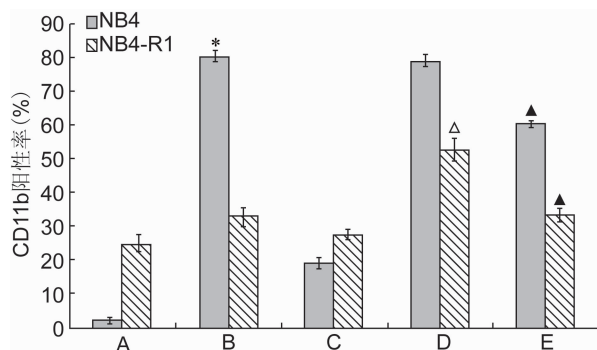
图 3 MAT 对 NB4、NB4-R1 细胞株 NBT 阳性率的影响及 H9 的拮抗作用

3 MAT 对 NB4、NB4-R1 细胞表面分化抗原 CD11b 表达的影响及 H9 的拮抗作用(图 4) NB4-R1 细胞初始 CD11b 表达水平(25.0 ± 5.9)% 高于 NB4 细胞(1.8 ± 1.7)%。MAT 单用能提高 NB4 细胞 CD11b 表达,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。ATRA 单用能提高 NB4 细胞 CD11b 水平($P < 0.01$),但对 NB4-R1 无显著作用。联用 MAT 后,NB4-R1 细胞 CD11b 表达升高($P < 0.05$)。H9 作用能减少两细胞株 CD11b 阳性率($P < 0.05$)。

4 MAT 对 NB4、NB4-R1 细胞 PML/RARα、PLSCR1 蛋白表达的影响及 H9 的拮抗作用(图 5-7) 单用 ATRA 能抑制 NB4 细胞内 PML/RARα 融合蛋白表达,并上调 NB4、NB4-R1 细胞 PLSCR1 蛋白表达水平($P < 0.01$)。单用 MAT 对两细胞株 PML/RARα、PLSCR1 蛋白表达无明显影响。ATRA 联用 MAT 不能进一步抑制 NB4 细胞 PML/RARα 蛋白表达,但能抑制 NB4-R1 细胞 PML/RARα 融合蛋白表达($P < 0.01$);并上调两细胞株 PLSCR1 蛋白表达($P < 0.01$)。H9 拮抗后,两细胞株 PML/RARα 融合蛋白表达水平显著增加,而 PLSCR1 蛋白表达明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

5 MAT 对 NB4、NB4-R1 细胞 PML/RARα、PLSCR1 mRNA 表达的影响及 H9 的拮抗作用(表 2)

单用 ATRA 能抑制 NB4 细胞内 PML/RARα mRNA 表达,并上调 PLSCR1 mRNA 表达水平($P < 0.01$)。单用 MAT 对两细胞株 PML/RARα、PLSCR1 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。ATRA 联用 MAT 能进一步抑制 NB4 细胞 PML/RARα mRNA 表达,并且较单用 ATRA 差异有统计学意义($P < 0.05$); NB4-R1 细胞 PML/RARα、PLSCR1 mRNA 表达亦较



注:A 为空白对照组;B 为 ATRA 组;C 为 MAT 组;D 为 ATRA 加 MAT 组;E 为 ATRA 加 MAT 加 H9 组;与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 ATRA 组比较, Δ $P < 0.05$; 与 ATRA 加 MAT 组比较, ▲ $P < 0.05$

图 4 MAT 对 NB4、NB4-R1 两细胞株 CD11b 表达的影响及 H9 的拮抗作用

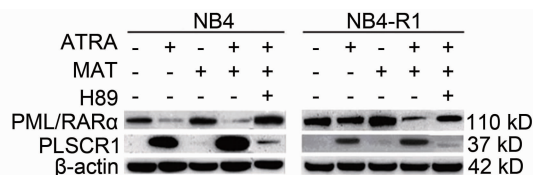
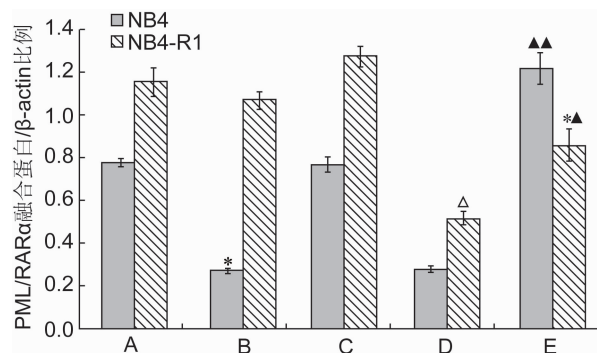


图 5 MAT 对 NB4、NB4-R1 细胞 PML/RARα、PLSCR1 蛋白表达的影响



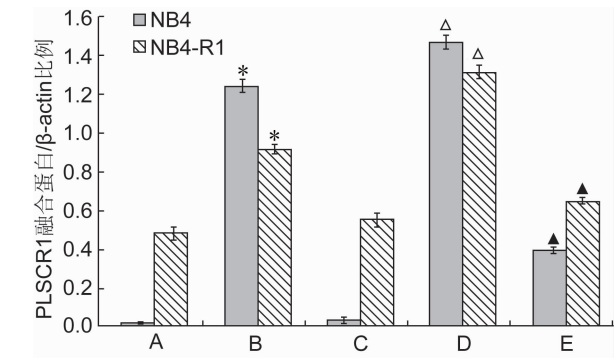
注:A 为空白对照组;B 为 ATRA 组;C 为 MAT 组;D 为 ATRA 加 MAT 组;E 为 ATRA 加 MAT 加 H9 组;与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 ATRA 组比较, Δ $P < 0.01$; 与 ATRA 加 MAT 组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

图 6 MAT 对 NB4、NB4-R1 细胞 PML/RARα 蛋白表达灰度值的影响

表 2 MAT 对 NB4、NB4-R1 细胞 PML/RARα、PLSCR1 mRNA 表达的影响及 H89 的拮抗作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NB4		NB4-R1	
		PML/RARα mRNA	PLSCR1 mRNA	PML/RARα mRNA	PLSCR1 mRNA
空白对照	3	1	1	1	1
ATRA	3	0.313 028 ± 0.068 068 **	4.127 406 ± 0.306 345 **	0.894 485 ± 0.058 683	1.660 265 ± 0.266 556
MAT	3	1.273 611 ± 0.347 348	1.501 203 ± 0.415 798	1.553 370 ± 0.048 925	1.202 562 ± 0.119 199
ATRA 加 MAT	3	0.142 687 ± 0.023 322 △	4.895 624 ± 0.192 077	0.502 836 ± 0.055 648 △	2.548 793 ± 0.255 913 △
ATRA 加 MAT 加 H89	3	0.945 507 ± 0.058 574 ▲▲	2.139 236 ± 0.108 840 ▲▲	1.034 666 ± 0.108 220 ▲	1.773 779 ± 0.213 933 ▲

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 ATRA 组比较，△ $P < 0.05$ ；与 ATRA 加 MAT 组比较，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$



注：A 为空白对照组；B 为 ATRA 组；C 为 MAT 组；D 为 ATRA 加 MAT 组；E 为 ATRA 加 MAT 加 H89 组；与 A 组比较，* $P < 0.01$ ；与 ATRA 组比较，△ $P < 0.01$ ；与 ATRA 加 MAT 组比较，▲ $P < 0.05$

图 7 MAT 对 NB4、NB4-R1 细胞 PLSCR1 蛋白表达灰度值的影响

单用 ATRA 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。H89 联合作用后,两细胞株 PML/RARα mRNA 表达上调,同时 PLSCR1 mRNA 表达明显受抑制($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

讨 论

临床上约 90% 的典型 APL 表现出 t(15;17) 及 PML/RARα 融合基因/蛋白阳性^[2],导致 RARα 调节的细胞分化功能障碍。目前,针对 APL ATRA 耐药现象,多借助于联合其他化疗(三氧化二砷、干扰素、蒽环类等),但仍有一部分患者不能获得分子水平缓解,或在维持治疗结束后复发。APL 细胞株 NB4-R1 内 cAMP 水平特异性降低,导致 cAMP 信号通路障碍,继而发生 ATRA 耐药^[7]。本课题组前期研究表明 MAT 联合 ATRA 能有效逆转 APL 细胞株 NB4-R1 的维甲酸耐药现象,其作用机制可能与上调耐药细胞内 cAMP 浓度以及 PKA 活性有关^[4]。本研究旨在进一步深入明确 MAT 的作用机制,并且探讨与 cAMP/PKA 信号通路的关系。

本研究发现,MAT 联合 ATRA 能提高耐药细胞 NBT 及 CD11b 阳性率($P < 0.01$),同时 PML/RARα 融合基因/蛋白降解,而此过程能被 PKA 拮抗剂 H89

阻碍,表明 MAT 发挥逆转耐药作用与其上调 cAMP/PKA 水平密切相关。

cAMP 与钙离子主管细胞内通讯,两者具有协同作用,cAMP 通过激活 PKA 使 1,4,5 - 三磷酸肌醇受体 (inositol-1,4,5-trisphosphate receptor, IP3R) 磷酸化而促进细胞膜对钙离子的内流,使细胞内钙离子增加。PLSCR1 是钙信号途径的下游分子,属钙结合蛋白。研究发现,APL 细胞在给予 ATRA 诱导分化后,PLSCR1 mRNA 表达显著上调^[8],而在 PLSCR1^{-/-} 的小鼠,其骨髓髓系祖细胞的增殖及分化明显受阻^[9],提示 PLSCR1 在细胞信号及细胞成熟中同样起着重要的作用。APL ATRA 耐药细胞 NB4-R1 在单用 cAMP 或 ATRA 作用时,钙信号途径相关基因表达均低表达,只有两者合用时才能使得 PLSCR1 表达恢复正常水平^[10]。

本研究结果显示,NB4-R1 细胞株 PLSCR1 表达水平显著高于 NB4。ATRA 作用后,NB4 细胞 PLSCR1 在蛋白及 mRNA 水平表达均得到明显增强 ($P < 0.01$),而在 NB4-R1 细胞内同样表达上调,但仅在蛋白水平差异有统计学意义($P < 0.01$)。在联用 MAT 后两细胞株 PLSCR1 蛋白表达进一步上升($P < 0.01$),并且 NB4-R1 细胞在基因水平差异有统计学意义($P < 0.01$),该现象同样可被 10 μmol/L H89 显著抑制,与 PML/RARα 融合基因/蛋白表达基本一致。对于 ATRA 显著上调 NB4-R1 细胞 PLSCR1 蛋白表达的现象,考虑可能与 ATRA 无法有效活化 NB4-R1 细胞内蛋白的泛素化降解有关(包括 PML/RARα 融合蛋白)^[11, 12],导致蛋白水平的累积较明显。

综上,MAT 联合 ATRA 能显著诱导 NB4-R1 细胞获得再分化,同时抑制 PML/RARα 融合基因/蛋白的表达。这可能与 MAT 活化耐药细胞 cAMP/PKA 通路密切相关,继而协同活化钙信号途径相关基因,其中 PLSCR1 的表达可能是关键因素之一。

参 考 文 献

[1] Adès L, Guerci A, Raffoux E, et al. Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia

- after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience[J]. *Blood*, 2010, 115(9): 1690-1696.
- [2] 中华医学会血液病分会, 中国医师协会血液科医师分会. 中国急性早幼粒细胞白血病诊疗指南(2014 版)[J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(5): 475-477.
 - [3] Long Y, Lin XT, Zeng KL, et al. Efficacy of intramuscular matrine in the treatment of chronic hepatitis B[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 3(1): 69-72.
 - [4] Wu D, Shao K, Sun J, et al. Matrine cooperates with all-trans retinoic acid on differentiation induction of all-trans retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cells (NB4-LR1): possible mechanisms[J]. *Planta Med*, 2014, 80(5): 399-408.
 - [5] 朱付云, 吴迪炯, 邵科钉, 等. Topo II β 在苦参碱诱导维甲酸耐药急性早幼粒细胞白血病分化中的作用研究[J]. *浙江中医药大学学报*, 2012, 36(12): 1255-1260.
 - [6] 吴迪炯, 周郁鸿, 朱俊, 等. 苦参碱缓解急性早幼粒细胞性白血病维甲酸耐药的研究[J]. *中华血液学杂志*, 2011, 22(5): 313-316.
 - [7] 朱琦, 余韵, 贾培敏, 等. 三氧化二砷联合 8-CPT-cAMP 诱导维甲酸耐药早幼粒细胞白血病细胞分化的实验研究[J]. *中华血液学杂志*, 2003, 24(1): 6-9.
 - [8] Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance[J]. *Oncogene*, 2003, 22(47): 7305-7315.
 - [9] Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T, et al. Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1[J]. *Blood*, 2002, 99(11): 4030-4038.
 - [10] 郑培丞, 侯娟, 曹颖平, 等. 全反式维甲酸诱导 APL 细胞分化过程中钙信号途径基因表达水平的变化[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(2): 282-285.
 - [11] Pitha-Rowe IL, Hassel BA, Dmitrovsky E. Involvement of UBE1L in ISG15 conjugation during retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18178-18187.
 - [12] Fang Y, Zhou X, Lin M, et al. The ubiquitin-proteasome pathway plays essential roles in ATRA-induced leukemia cells G₀/G₁ phase arrest and transition into granulocytic differentiation[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(11): 1157-1167.

(收稿:2015-04-16 修回:2015-08-10)

第一届国际脑心同治高峰论坛在南宁召开

“第一届国际脑心同治高峰论坛暨第五届全国中西医结合脑心同治学术交流会”于 2015 年 4 月 10—12 日在南宁市举办。本次大会由中国中西医结合学会脑心同治专业委员会主办,广西中西医结合学会脑心同治专业委员会承办。来自国内外 30 多位国际心脑血管病专家到会,与会人员达 1 500 人。

会议邀请了国际专家、国内知名院士、专家做精彩的学术报告。本次大会主要内容包括“心脑血管病国内外最新研究进展和指南解读”、“脑心同治理论指导下的用药标准研究”、“脑心同治理论与实践最新研究进展”、“用脑心同治理论保护亚健康人群”等,围绕脑心同治、心脑血管病领域的最新热点及亟待解决的问题,以分论坛开展形式多样、内容丰富的学术交流活动。

学术报告内容精彩纷呈:天津中医药大学张伯礼院士作了题为“中药现代化研究进展”主题报告,中国人民解放军总医院陈香美院士围绕“中西医结合‘脑-心-肾’一体化研究”做了精彩报告,哈尔滨医科大学杨宝峰院士围绕“基于最佳靶点假说的抗心律失常中药研究”做了精彩报告,美国哈佛大学医学院麻省总医院的王晓英教授、解放军海军总医院的戚晓昆教授、美国塔夫茨医学中心的 Dr. Sami Noujaim 分别作了“Stroke: A Systematic Disease, TCM Intervention Strategy”、“脑心同治理论的临床实践”、“Cellular Mechanisms of Wenxinkeli Antiarrhythmic Action”主题报告,带来了新的视角。随后,哈萨克斯坦国立医学院 CHEMERIS ANDREY 教授做了题为“稳心颗粒在哈萨克斯坦的临床疗效分析”的主题报告,印尼陆军医院 HARDHI PRANATA 教授做了“中风在印度尼西亚及天然药物对中风患者的应用”的报告,介绍了印度尼西亚当地中风的发病情况以及脑心通在神经内科的用药情况。

(中国中西医结合学会脑心同治专业委员会 供稿)