表 1 两组干预前后外周血细胞计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	WBC($\times 10^9$/L)	RBC($\times 10^{12}$/L)	HGB(g/L)	PLT($\times 10^9$/L)
正常对照	5	干预前	7.3 ±3.2	8.4 ±4.6	123 ±13	619 ±57
		干预后	7.1 ±2.9	7.1 ±2.9	131 ±21	665 ±82
模型	5	干预前	8.6 ±5.1	9.8 ±5.6	131 ±26	636 ±59
		干预后	21.5 ±8.1 *	5.7 ±4.3 *	82 ±26 *	425 ±98 *

注:与正常对照组干预后比较,*P <0.05

现不同程度成模表现:消瘦、弓背症状、皮下包块增大。与正常对照组比较,模型组 WBC 明显增高,RBC、PLT 和 HGB 均明显下降,差异有统计学意义(P <0.05),小鼠 100% 成模;实验中各组小鼠未出现死亡,顺利完成实验。

3 各组 P-gp 表达水平比较(表 2、图 2) 与模型组比较,ADM + PESV 高、中、低剂量组 P-gp 值降低,差异有统计学意义(P <0.05);分别与 ADM 组和 PESV 组比较,ADM + PESV 高剂量组 P-gp 值均明显降低(P <0.05)。

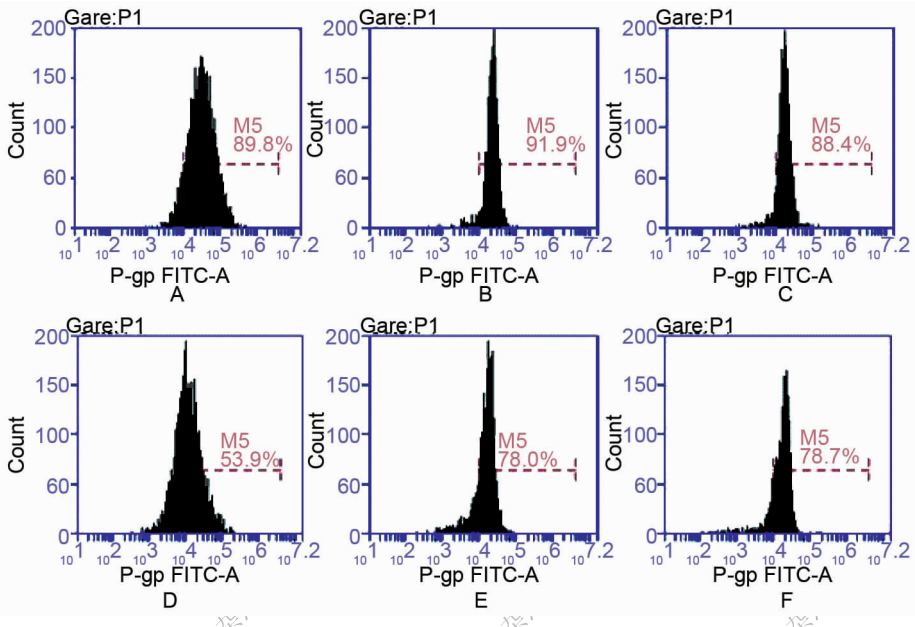
表 2 各组 P-gp 表达率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	P-gp
模型	5	89.8 ±4.73
ADM	5	91.9 ±3.68
PESV	5	88.4 ±4.65
ADM + PESV 高剂量	5	53.9 ±1.79 *△▲
ADM + PESV 中剂量	5	78.0 ±5.20 *
ADM + PESV 低剂量	5	78.7 ±3.28 *△

注:与模型组比较,*P <0.05;与 ADM 组比较,△P <0.05;与 PESV 组比较,▲P <0.05

4 各组 BCRP、MDR1 mRNA 表达水平比较(表 3) 与模型组比较,PESV 组、ADM + PESV 高、中剂量组 BCRP mRNA 表达均明显降低(P <0.05);PESV 组、ADM + PESV 高、中、低剂量组 MDR1 mRNA 表达均明显升高(P <0.05);ADM 组 BCRP、MDR1 mRNA 表达比较,差异均无统计学意义(P >0.05)。分别与 ADM 组、PESV 组比较,ADM + PESV高剂量组 BCRP、MDR1 mRNA 表达明显降低,差异有统计学意义(P <0.05)。

5 各组 ALDH1 阳性细胞比较(表 4、图 3) 瘤块组织细胞细胞质内颗粒状染色为棕黄色或棕色即为 ALDH1 阳性表达蛋白,模型组、ADM 组、PESV 组中 ALDH1 阳性细胞分布密集,细胞质内颗粒以棕黄色为主,棕色颗粒易见;ADM + PESV 高、中、低剂量组 ALDH1 阳性细胞散在分布,胞浆内颗粒以棕色为主,棕黄色颗粒少见。与模型组比较,ADM 组、PESV 组、ADM + PESV 高、中、低剂量组 ALDH1 阳性表达比较,差异无统计学意义(P >0.05)。



注:A 为模型组;B 为 ADM 组;C 为 PESV 组;D 为 ADM + PESV 高剂量组;E 为 ADM + PESV 中剂量组;F 为 ADM + PESV 低剂量组;图 3,4 同

图 2 BALB/c 裸鼠瘤块中 K562/A02 干细胞细胞膜 P-gp 表达

中国中西医结合杂志

表 3　各组 BCRP、MDR1 mRNA 表达水平比较（$2^{-\triangle\triangle Ct}$，$\bar{x}\pm s$）

组别	n	BCRP	MDR1
模型	5	1	1
ADM	5	1.08 ± 0.27	1.23 ± 0.21
PESV	5	0.52 ± 0.14 *	99.34 ± 0.38 *
ADM + PESV 高剂量	5	0.25 ± 0.12 *△▲	1.88 ± 0.17 *△▲
ADM + PESV 中剂量	5	0.79 ± 0.18 *	6.08 ± 0.57 *
ADM + PESV 低剂量	5	1.01 ± 0.21	29.08 ± 0.36 *

注：与模型组比较，*P < 0.05；与 ADM 组比较，△P < 0.05；与 PESV 组比较，▲P < 0.05

表 4　各组 ALDH1 阳性细胞百分比比较（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	n	ALDH1
模型	5	45.9 ± 5.18
ADM	5	49.7 ± 4.15
PESV	5	40.9 ± 6.21
ADM + PESV 高剂量	5	33.2 ± 3.65
ADM + PESV 中剂量	5	38.9 ± 4.68
ADM + PESV 低剂量	5	42.4 ± 5.14

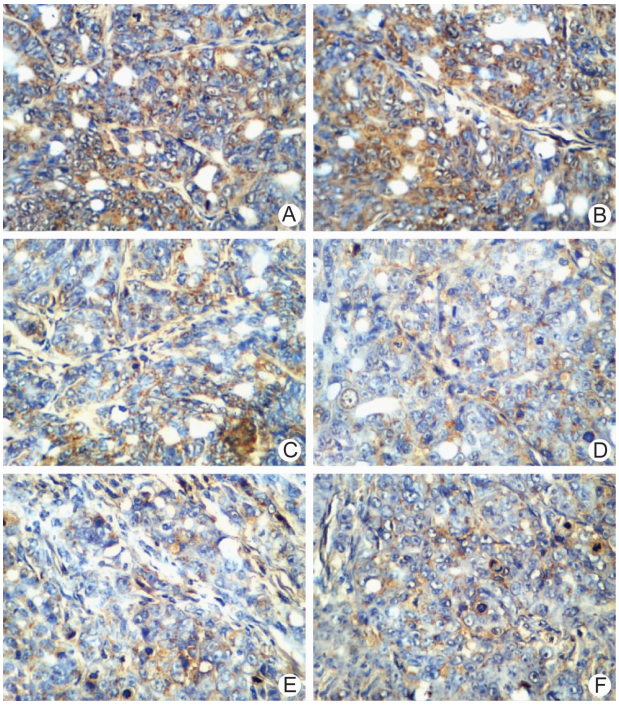


图 3　各组 BALB/c 裸鼠瘤块免疫组化比较（免疫组化，×20）

6　各组 PI3K 蛋白相对定量值比较（表 5、图 4）　与模型组比较，ADM + PESV 高、中、低剂量组 PI3K 蛋白表达下调，差异有统计学意义（P < 0.05）；与 ADM 组和 PESV 组比较，ADM + PESV 高剂量组 PI3K 蛋白表达均下调（P < 0.05）。

表 5　各组 PI3K 蛋白相对定量值比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	PI3K（相对定量值）
模型	5	1
ADM	5	1.12 ± 0.07
PESV	5	0.98 ± 0.11
ADM + PESV 高剂量	5	0.47 ± 0.09 *△▲
ADM + PESV 中剂量	5	0.53 ± 0.10 *
ADM + PESV 低剂量	5	0.62 ± 0.15 *

注：与模型组比较，*P < 0.05；与 ADM 组比较，△P < 0.05；与 PESV 组比较，▲P < 0.05

图 4　各组 PI3K 蛋白表达印迹图

7　各组 NF-κB 因子水平比较（图 5，表 6）　根据标准曲线求出 NF-κB 值分析结果，与模型组比较，PESV 组、ADM + PESV 高剂量组 NF-κB 水平下调，差异有统计学意义（P < 0.05）；ADM 组及 ADM + PESV 中、低剂量组 NF-κB 水平比较，差异无统计学意义（P > 0.05）。与 ADM 组和 PESV 组比较，ADM + PESV 高剂量组 NF-κB 水平均下调（P < 0.05）。

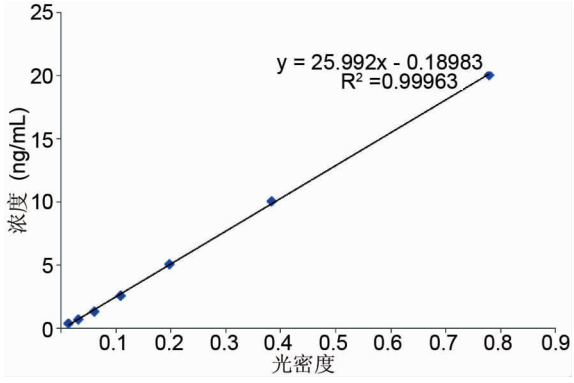


图 5　NF-κB 标准曲线

表 6　各组 NF-κB 表达比较（ng/mL，$\bar{x}\pm s$）

组别	n	NF-κB
模型	5	6.44 ± 1.45
ADM	5	7.14 ± 0.96
PESV	5	8.87 ± 1.15 *
ADM + PESV 高剂量	5	5.88 ± 1.08 *△▲
ADM + PESV 中剂量	5	6.59 ± 2.21
ADM + PESV 低剂量	5	7.16 ± 1.51

注：与模型组比较，*P < 0.05；与 ADM 组比较，△P < 0.05；与 PESV 组比较，▲P < 0.05

讨　论

LSC 产生 MDR 阻碍了化疗治愈白血病，尽管一

些 MDR 机制已经提出,但 MDR 机制极其复杂,MDR 是肿瘤细胞对化学药物攻击的重要防御机制。LSC 通过细胞膜、细胞质及细胞核的分子改变和功能变化得以实现的,LSC 对化疗药物作出系统反应保全自身的干性。

LSC 依靠细胞膜 ABC 超家族中 P-gp 和 BCRP 药物泵降低细胞内化疗药物浓度,P-gp 是 Biedler 等于 1976 年在研究 CHO 细胞时发现的,在多药耐药细胞的细胞膜上存在一种分子量为 1.7×10^5 kD,整个分子由几乎完全相同的两个亚基构成,每部分具有 6 个跨膜区和一个 ATP 结合位点,P-gp 位于细胞膜和细胞质的高尔基体,两者是 P-gp 转运药物的重要场所[9]。BCRP 是半转运蛋白,首先在乳腺癌细胞中获得,因而被命名为乳腺癌耐药蛋白,有一个 ATP 结合位点和 6 个跨膜螺旋,BCRP 基因的 mRNA 为 2.4 kb,相对分子质量约为 726,可编码 655 个氨基酸,全长 66 kb,由 15 个内含子和 16 个外显子构成,外显子大小为 60 ~ 332 bp 不等。

LSC 在细胞质中表达的 ALDH1 是一种解毒细胞溶质酶,能氧化细胞内的乙醛变成乙酸,包括视黄醇转变成视黄酸,视黄酸具有调节细胞增殖和分化的功能,并能维系不同干细胞的表型[10]。ALDH1 位于 9q21 染色体,由 53×10^3 个碱基对组成,含 13 个外显子,共编码 501 个氨基酸,无重复序列,N 端为蛋氨酸(Met),有 1 个谷氨酸(Glu)和 1 个半胱氨酸(Cys)激活点,其基因启动区含 1 个 ATA 盒和 1 个 CCAAT 盒,分别位于转录起始部位上游的 32 bp 和 74 bp 处[11]。研究证实 ALDH1 与恶性肿瘤的耐药性相关,它能氧化环磷酰胺的中间代谢产物醛磷酰胺,形成无毒的梭基磷酰胺,从而发挥对环磷酰胺的解毒作用[12]。

此外,LSC 形成 MDR 的 PI3K/NF-κb/MDR1 信号通路激活细胞核内 MDR1 基因,MDR1cDNA 位于人类 7 号染色体的 q21.1 带上,编码 4.5 ~ 5.0 kb mRNA,长 4 669 bp,其第 179 ~ 3 840 bp 为可读区,起始密码为 ATG,共编码 1 280 个氨基酸残基,经折叠修饰后形成定位于细胞质和高尔基体的 P-gp[13]。白血病细胞表面的酪氨酸蛋白激酶受体(receptor tyrosine kinases,RTK)通过接收胞外多种生长因子如胰岛素(Insulin)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)、人生长因子(human growth factor,HGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)等配体信号刺激而被激活,激活的 RTK 通过 PI3K 将信号转递到细胞内激活 AKT。AKT 属于 PI3K 重要的下游分子,激活 IκB 激酶(IKKα)进而导致 NF-κB 的抑制剂 IκB 的降解,使 NF-κB 从细胞质中释放出来进行核转位,NF-κB 与 MDR1 基因启动子结合,MDR1 的 DNA 完成 mRNA 转录。LSC 贯穿细胞膜、细胞质及细胞核的 MDR 机制体系形成。

PESV 是蝎毒多肽提取物的简称,是由蝎毒冻干粉经葡聚糖凝胶,收集蝎毒Ⅲ ~ Ⅳ蛋白峰,再进行阳离子交换层析而成。PESV 组份Ⅲ通过下调 Bcl-2 基因和激活 Caspase-3 途径促进人肝癌细胞株 HepG2 的凋亡[14],PESV 组分Ⅳ作用及机理尚未明确。本次实验中发现 ADM 作用 LSC 能够独立激活 LSC 细胞膜、细胞质及细胞核的 MDR 机制体系,当 ADM 联合高剂量 PESV 共同作用 LSC,LSC 的 P-gp、BCRP、MDR1、PI3K、NF-κB 表达下调;说明 ADM 和 PESV 联合应用时 LSC 却未表现出 MDR 体系作用的增强,相反 MDR 体系作用在减弱,这样结果证实了 LSC 在 ADM 损伤后 PESV 对其 MDR 的逆转作用显著性增强,PESV 可以提高白血病细胞对 ADM 的敏感性。这与大黄䗪虫丸含药血清[15]和植物雌激素毛蕊异黄酮[16]的研究结果相一致。但是,本次实验未能证明 PESV 剂量与 MDR 的相关性,实际上 LSC 的 MDR 除细胞膜、细胞质及细胞核的分子改变外,还与 LSC 在龛内迁移、活化、G0 期变化等因素相关,都有待于进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 王春淮,陈运贤. 白血病干细胞的耐药机制研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(3): 203 -206.

[2] Mrimoto K, Kim SJ, Tanei T, et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenate 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression[J]. Cancer Sci, 2009, 100(6): 1062 -1068.

[3] 杨向东,李红玉,李德冠,等. 蝎毒多肽对白血病细胞株 KG1a 干细胞活性的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(4): 101 -103.

[4] 成志勇,李琳,王亚丽,等. PTEN 基因逆转白血病多因素多药耐药机制探讨[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(2): 142 -147.

[5] 郝征,杨文华. 蝎毒多肽干预急性白血病髓外浸润传变的机制[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 1106 -1108.

[6] Yan X, Zhi F, Xu GM, et al. Overcoming multidrug-resistance *in vitro* and *in vivo* using the novel P-glycoprotein inhibitor 1416[J]. Bioscience, 2012(32): 559 -566.

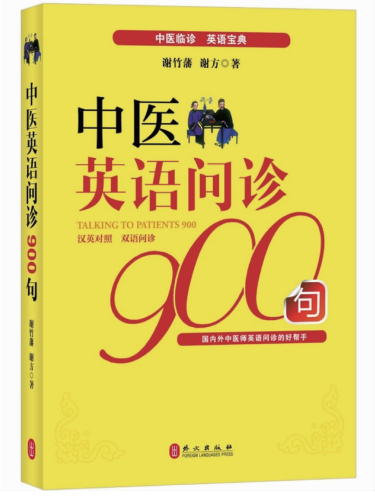
[7] Huang FF, Zhang L, Wu DS, et al. PTEN regu-

lates BCRP/ABCG2 and the side population through the PI3K/Akt pathway in chronic myeloid leukemia[J]. PLoS One, 2014(9): e88298.
[8] 曹渊, 惠璐璐, 秦蓉, 等. 白血病多药耐药裸鼠荷瘤模型的建立[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2013, 34(3): 302 -307.
[9] Tian KG, Wang YZ, Huang Y. Methylation of WTH3, a possible drug resistant gene, inhibits p53 regulated expression [J]. BMC Cancer, 2008, 8(327): 1186 -1190.
[10] Adam SA, Schnell O, Poschl J, et al. ALDH1A1 is a marker of astrocytic differentiation during brain development and correlates with better survival in glioblastoma patients[J]. Brain Pathol, 2012, 22(6): 788 -797.
[11] Moore SM, Liang T, Graves TJ, et al. Identification of a novel cytosolic aldehyde dehydrogenase allele, ALDH1A1 * 4[J]. Hum Genom, 2009, 3(4): 304 -307.
[12] 王兴,姜真,孙长岗. 乙醛脱氢酶 1 与乳腺癌耐药蛋白在乳腺癌中的表达及相关性研究[J]. 中国癌症杂志, 2014, 24(3): 175 -181.
[13] Perrin L, Gatouillat G, Balasse E, et al. Induction of autoantibodies to murine P-glycoprotein: consequences on drug sensitivity in MDR cancer cells and on the expression of MDR genes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358(1): 325 -330.
[14] 李建伟,胡静,张桂荣,等. 东亚钳蝎蝎毒多肽组分Ⅲ对肝癌细胞凋亡的影响[J]. 吉林大学学报, 2006, 32(4): 625 -627.
[15] 秦宝宁,滕文静,刘瑞娟,等. 大黄䗪虫丸对慢性粒细胞白血病 K562 细胞增殖凋亡及 PI3K/AKT 信号传导通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 522 -525.
[16] 辛敏,陈健,郭艳红. 毛蕊异黄酮对膀胱癌细胞凋亡和 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 广东医学, 2015, 36(5): 690 -694.

(收稿:2015 -05 -13　修回:2016 -03 -24)

· 书　讯 ·

国内第一本中医英语问诊手册——《中医英语问诊 900 句》出版



北京大学中西医结合科谢竹藩教授及其子谢方博士编写的中医英语问诊手册《中医英语问诊 900 句》由外文出版社于 2016 年 4 月出版。谢竹藩教授被世界卫生组织(WHO)誉为制定 WHO 西太平洋地区传统医学名词术语国际标准的领军核心,并曾多次在国外开班用英语系统地讲授中医和诊治病人。本书是谢竹藩教授与谢方博士合作将中医用语进行通俗化、实用化转换的专著,旨在让中医师有效地与不同文化背景的患者进行交流、询问病情,其内容具备科学性、通俗性和文化兼容性。本书筛选出了 75 种临床常见病症,将这些病症逐一定义并对其病因、病机和症候进行简要分析后,按照《景岳全书·十问篇》的原则和模拟门诊诊病的实际场景,将医生向患者了解病情时使用概率较大的问诊用语进行归纳整理,总结出 900 个常用问句。全书汉英对照,病症分析部分的语言系专业用语,问诊用句部分则以通俗语言表述。书中还对部分用词增加注释,说明不同译法的区别。书后附有索引以便查寻。另外,该书配有音频文件,读者可以通过扫描书中的二维码进入“医学无国界”微信公众号学习开口讲英语,必要时还可以选定问句播放给患者进行问诊。

本书可登陆外文出版社天猫店购买,同时在当当网等电商有售。读者也可拨打电话 010 -68995852 直接联系外文出版社图书发行部门购买该书。