

双黄升白颗粒对荷瘤鼠化疗骨髓抑制期 Wnt 信号通路的调控作用

王立芳 徐振晔 司海龙 王中奇 邓海滨 苏 婉

摘要 目的 探讨双黄升白颗粒对荷瘤鼠化疗骨髓抑制期 Wnt 信号通路的调控作用。**方法** 采用 Lewis 肺癌荷瘤鼠腹腔注射环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)胺造成化疗骨髓抑制模型,用双黄升白颗粒干预治疗,常规计数白细胞、红细胞、血小板数量和肿瘤质量,流式细胞法检测骨髓造血干细胞比例(Sca、CD34 双阳性细胞),实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)法检测 Wnt 信号通路主要基因(Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH、GSK3)mRNA 的表达。**结果** 治疗组白细胞数量、造血干细胞比例均高于模型组($P < 0.05$), Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH、GSK3 mRNA 在骨髓中的表达高于模型组($P < 0.05$), Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH mRNA 在肿瘤中的表达则低于模型组($P < 0.05$);各组红细胞、血小板、肿瘤质量、GSK3 mRNA 在肿瘤中的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 双黄升白颗粒治疗骨髓抑制的作用机制与调控 Wnt 信号通路有关,且该调控作用具有双重特性,即在上调骨髓 Wnt 信号通路主要基因表达同时抑制肿瘤中部分基因表达。

关键词 双黄升白颗粒;Wnt 信号;骨髓抑制

Effect of Shuanghuang Shengbai Granule on Wnt Signal Transduction Pathway in Tumor-bearing Mice with Chemotherapy Induced Myelosuppression WANG Li-fang, XU Zhen-ye, SI Hai-long, WANG Zhong-qi, DENG Hai-bin, and SU Wan Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)

ABSTRACT Objective To observe the regulation of Shuanghuang Shengbai Granule (SHSBG) on regulating Wnt signaling pathway in tumor-bearing mice with chemotherapy induced myelosuppression. **Methods** Chemotherapy induced myelosuppression model was established in Lewis lung tumor bearing mice by intraperitoneal injection of cyclophosphamide (CTX). And then they were intervened by SHSBG. Routine white blood cell (WBC) count, red blood cell (RBC) count, platelet count, and tumor mass were calculated. Ratios of bone marrow hematopoietic stem cell (Sca, CD34 double positive cells) were detected by flow cytometry. mRNA expression of main genes in Wnt signaling pathway (Wnt, β -catenin, Frizzled, DSH, GSK3) were detected using real time fluorescent quantitative PCR. **Results** The number of WBC and ratio of hematopoietic stem cells in the treatment group were higher than those in the model group ($P < 0.05$). Expressions of Wnt, β -catenin, Frizzled, DSH, and GSK3 mRNA in the bone marrow were higher in the treatment group than in the model group ($P < 0.05$). Expressions of Wnt, β -catenin, Frizzled, and DSH mRNA expression in tumors were lower in the treatment group than in the model group ($P < 0.05$). There was no statistical difference in counts of RBC and platelet, tumor mass, or GSK3 mRNA expression among all groups ($P > 0.05$). **Conclusions** The mechanism for SHSBG treating myelosuppression was related to regulating Wnt signaling pathway. Besides, it had dual regulation effect on Wnt signaling pathway, up-regulating expressions of main genes in Wnt signaling pathway while inhibiting expressions of partial genes in tumors.

KEYWORDS Shuanghuang Shengbai Granule; Wnt signal; myelosuppression

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No.81202670);上海市科委自然科学基金项目(No.12ZR1431800);龙医团队(No.LYTD-18)

作者单位:上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科(上海 200032)

通讯作者:王立芳, Tel:021-64385700, E-mail:13816927507@139.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.02.0204

骨髓抑制是肿瘤化疗常见毒副反应,主要表现为外周血细胞(尤其是白细胞)降低。双黄升白颗粒来源于上海市名中医徐振晔教授的临床经验方药,用于治疗肿瘤化疗骨髓抑制疗效良好^[1,2],前期研究表明该药对于细胞生长具有双重调控作用^[3-5],本实验在前期研究基础上从 Wnt 信号通路调控角度对其双重调控作用进行进一步分析探讨。

材料与方法

1 动物 SPF 级近交系 C57BL/6J 小鼠,购自上海斯莱克实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(沪)2012-0001,SPF 级,雄性,20 g 左右,饲养于上海中医药大学附属龙华医院 SPF 级饲养室。Lewis 肺癌细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 药物 双黄升白颗粒由生黄芪、黄精、天花粉、骨碎补、女贞子等组成,上海中医药大学附属龙华医院中药房提供(沪卫药剂 S96-I01),蒸馏水溶解,每毫升含生药 2 g。注射用 CTX:0.2 g/支,江苏恒瑞医药股份有限公司生产,批号:13052425。

3 试剂与仪器 cDNA 合成试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒由 Bioline 公司生产。引物探针由上海捷瑞生物工程公司合成。旋涡振荡器(Vortex, XW-80A,上海青浦泸西仪器厂)。干式恒温器(K10CD,杭州蓝焰科技有限公司)。冷藏冰箱(BDC-280e,湖南长沙伊来克斯电器公司)。低温冷冻离心机(1-15k3K15,美国 Sigma 公司)。生物安全柜(TYPE B2,美国 Sigma 公司)。紫外杀毒车(ZXC 型,上海跃进医用光学器械厂)。Real-time 检测仪(7500Sequence Detection System,ABI-7500,美国 ABI 公司)。倒置式系统显微镜(IX70, Olympus 公司),流式细胞仪 FACS Calibur(BD 公司)。

4 模型制作及分组用药 Lewis 肺癌的种鼠无菌条件下剥离瘤块,制成匀浆,调整至细胞数量 $1 \times 10^7/L$,0.2 mL/只接种于小鼠腋下^[6]。待肿瘤生长至可触摸到时选择肿瘤大小相似的荷瘤鼠随机分为治疗组、模型组、空白组,另设模拟接种与模拟治疗的正常

组,每组 8 只。治疗组腹腔注射 CTX^[7],每日 2 mL,相当于每日 100 mg/kg,连续 3 日;灌服双黄升白颗粒溶液,每日 0.4 mL,相当于每日生药 40 g/kg,连续 6 日。模型组腹腔注 CTX 用法同治疗组;灌服生理盐水,每日 0.4 mL,连续 6 日。空白组与正常组腹腔注射生理盐水 2 mL,连续 3 日;每日灌服生理盐水 0.4 mL,连续 6 日。各组分别于最后 1 日用药后 2 h 摘眼球采血,颈椎脱臼处死,无菌无 RNA 酶条件下迅速剥取肿瘤及股骨。

5 检测指标与方法

5.1 血常规 血液 EDTA 抗凝,自动血检测仪检测白细胞(WBC)、血小板(PLT)、红细胞(RBC)数量。

5.2 骨髓有核细胞数(BMNC) 以 PBS 液反复冲洗骨髓腔,直至骨髓腔发白,加入红细胞裂解液,去除红细胞,PBS 洗后重新悬浮为 1 mL,取 0.1 mL 细胞计数板显微镜下计数有细胞核的细胞数量,计数所得的 10 倍即为单侧股骨总有核细胞数。

5.3 肿瘤质量 小鼠处死后剥取肿瘤,电子天平称重。

5.4 骨髓造血干细胞 Sca-1、CD34 为小鼠造血干细胞主要标志,本研究检测骨髓 Sca-1⁺CD34⁺细胞以比较造血干细胞数量,吸取 100 μL 细胞悬液(细胞浓度 $\geq 1 \times 10^6$ 个/mL),分别加入 10 μL Sca-1 抗体和 CD34 抗体,避光孵育 20 min,溶红细胞处理仪机洗后,重新悬浮,上流式细胞仪检测。

5.5 Wnt 信号通路主要基因表达(Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH、GSK3) 以 FQ-PCR 法检测 Wnt 信号通路中 Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH、GSK3 mRNA 的表达。引物序列及 PCR 产物大小:引物序列查询及引物合成由上海捷瑞生物工程公司完成,引物设计软件为 Primer5,纯化方式为 PAGE,内参 GAPDH。引物序列见表 1。

分别将骨髓细胞与肿瘤组织置于研磨器(1.5 mL EP 管)中加入 1 mL 预冷的 Trizol 研磨,常规进行 mRNA 抽提;cDNA 第一链合成(反应条件:45 $^{\circ}C$; 30 min 逆转录;85 $^{\circ}C$,5 min 灭活 MMLV),-20 $^{\circ}C$ 冰

表 1 PCR 引物基因序列

基因	上游引物	下游引物	产物(bp)
GAPDH	5'-AACTTTGGCATTTGTGGAAGG-3'	5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'	132
Wnt	5'-CGTGTGGATGTTCAAATGC-3'	5'-TGTCCCAAAGGACTGAAGG-3'	163
β -catenin	5'-GCTTCTGGGTCCGATGATA-3'	5'-TGGCACACCATCATCTTGTT-3'	99
Frizzled	5'-CTGCCCATCAAGATGTTCT-3'	5'-GAACTGTTCTCCGCTGTTCCCT-3'	151
DSH	5'-TCCAAAGCTCACATCCACTG-3'	5'-GGGACGTAAGTCCTTCACCA-3'	132
GSK3	5'-CAGTGGTGTGGATCAGTTGG-3'	5'-CCAAGGATGTGCCTTGATTT-3'	163

箱,保存,待用,Real-time PCR 检测,PCR 扩增检测条件:(1)预变性:95 ℃,5 min;(2)变性:95 ℃ 15 min,60 ℃ 15 min,40 循环。数据采用仪器自带软件 ABI Prism 7500 SDS Software 分析。mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$ 。 ΔCt = 目标基因 Ct 值 - 内参(GAPDH)Ct 值。

6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行相关数据统计分析,实验各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数间比较以单因素方差分析,若方差不齐则用 Dunnett'sT3 校正检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组荷瘤鼠 WBC、RBC、PLT 测定结果比较(表 2) 模型组应用 CTX 造模后 WBC 较正常组与空白组明显下降($P < 0.05$),但治疗组 WBC 高于模型组($P < 0.05$)。各组 RBC 与 PLT 比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组荷瘤鼠 WBC、RBC 及 PLT 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	PLT ($\times 10^9/L$)
治疗	8	3.31 $\pm$ 0.76 [▲]	9.25 $\pm$ 1.23	976.49 $\pm$ 152.27
模型	8	1.99 $\pm$ 0.79 ^{*△}	8.42 $\pm$ 1.46	908.85 $\pm$ 104.22
空白	8	6.60 $\pm$ 1.21	9.59 $\pm$ 1.56	1 014.50 $\pm$ 128.95
正常	8	6.52 $\pm$ 1.00	8.99 $\pm$ 1.59	1 055.18 $\pm$ 99.17

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与正常组比较,△ $P < 0.05$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$;下表同

2 各组荷瘤鼠 BMNC 比较(表 3) 模型组应用 CTX 造模后 BMNC 较正常组与空白组明显下降($P < 0.05$),治疗组 BMNC 高于模型组($P < 0.05$)。

表 3 各组荷瘤鼠 BMNC 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BMNC ($\times 10^7$ /股骨)
治疗	8	0.76 $\pm$ 0.12 [▲]
模型	8	0.45 $\pm$ 0.10 ^{*△}
空白	8	1.30 $\pm$ 0.12
正常	8	1.29 $\pm$ 0.11

3 各组瘤重比较 模型组瘤重(1.61 $\pm$ 0.15)g,低于空白组[(2.43 $\pm$ 0.12)g],差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组瘤重(1.53 $\pm$ 0.13)g,略低于模型组,

但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 各组荷瘤鼠 Sca-1⁺CD34⁺细胞率比较(表 4) 空白组与正常组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组双阳细胞比例高于空白组与正常组($P < 0.05$),治疗组双阳细胞比例高于模型组($P < 0.05$)。

表 4 各组荷瘤鼠 Sca-1⁺CD34⁺细胞率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Sca-1 ⁺ CD34 ⁺ 细胞率(%)
治疗	8	9.02 $\pm$ 1.48 [▲]
模型	8	7.47 $\pm$ 1.48 ^{*△}
空白	8	5.46 $\pm$ 1.55
正常	8	5.24 $\pm$ 1.31

5 各组骨髓及肿瘤中 Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH、GSK3 mRNA 表达比较(表 5,图 1、2) 骨髓中各基因表达:正常组与空白组比较各基因表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。模型组 Wnt、 β -catenin mRNA 表达高于正常组与空白组($P < 0.05$);治疗组 Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH、GSK3 mRNA 表达均高于模型组($P < 0.05$)。肿瘤组织中各基因表达:Wnt、 β -catenin、Frizzled mRNA 表达模型组高于空白组($P < 0.05$),治疗组则低于模型组($P < 0.05$),DSH mRNA 表达模型组与空白组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗组低于模型组($P < 0.05$);GSK3 mRNA 在 3 组中表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

双黄升白颗粒主要用于治疗肿瘤化疗骨髓抑制,是建立在中医辨证论治基础上的名中医经验方药,组方以补肾生髓为主。骨髓属于中医学“髓”的范畴,《内经》指出“盖髓者,肾精所生,精足则髓足”,“骨髓坚固,气血皆从”;《类经》指出:“肾之精液入心化赤而为血”。因而,肾精充足,然后才能“气血皆从”;反之,肾精不足,骨髓枯竭,则气血生化乏源。现代实验也证实了补肾生髓可从多方面发挥作用,影响造血^[8,9]。因而,在骨髓抑制的治疗中,补血为治其标,更重要的是补肾生髓以治其本。

表 5 各组荷瘤鼠骨髓及肿瘤中 Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH、GSK3 mRNA 表达比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Wnt mRNA		β -catenin mRNA		Frizzled mRNA		DSH mRNA		GSK3 mRNA	
		骨髓	肿瘤	骨髓	肿瘤	骨髓	肿瘤	骨髓	肿瘤	骨髓	肿瘤
治疗	8	3.55 $\pm$ 0.83 [▲]	2.41 $\pm$ 0.44 [▲]	4.92 $\pm$ 0.94 [▲]	1.11 $\pm$ 0.36 [▲]	3.83 $\pm$ 0.83 [▲]	0.40 $\pm$ 0.16 [▲]	2.22 $\pm$ 0.50 [▲]	0.66 $\pm$ 0.09 [▲]	3.20 $\pm$ 1.19 [▲]	1.70 $\pm$ 0.77
模型	8	1.79 $\pm$ 0.86 ^{△*}	4.74 $\pm$ 0.67 [*]	3.79 $\pm$ 0.45 ^{△*}	4.01 $\pm$ 1.41 [*]	2.61 $\pm$ 0.70	1.50 $\pm$ 0.41 [*]	1.27 $\pm$ 0.50	0.83 $\pm$ 0.25	0.97 $\pm$ 0.62	3.65 $\pm$ 2.42
空白	8	0.92 $\pm$ 0.31	1.55 $\pm$ 0.57	2.60 $\pm$ 1.17	0.43 $\pm$ 0.19	2.49 $\pm$ 0.68	0.24 $\pm$ 0.12	1.32 $\pm$ 0.36	0.71 $\pm$ 0.26	1.67 $\pm$ 0.61	3.62 $\pm$ 1.16
正常	8	0.78 $\pm$ 0.53	/	2.43 $\pm$ 0.78	/	2.03 $\pm$ 0.91	/	1.30 $\pm$ 0.39	/	0.89 $\pm$ 0.38	/

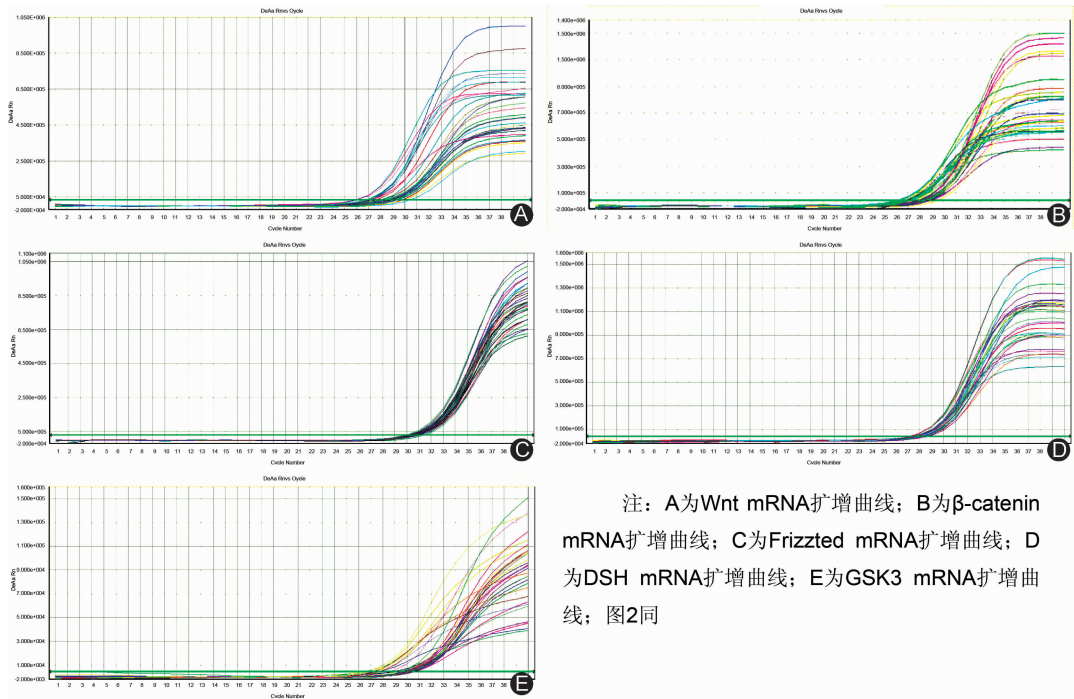


图 1 各组荷瘤鼠骨髓组织 Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH、GSK3 mRNA 扩增曲线

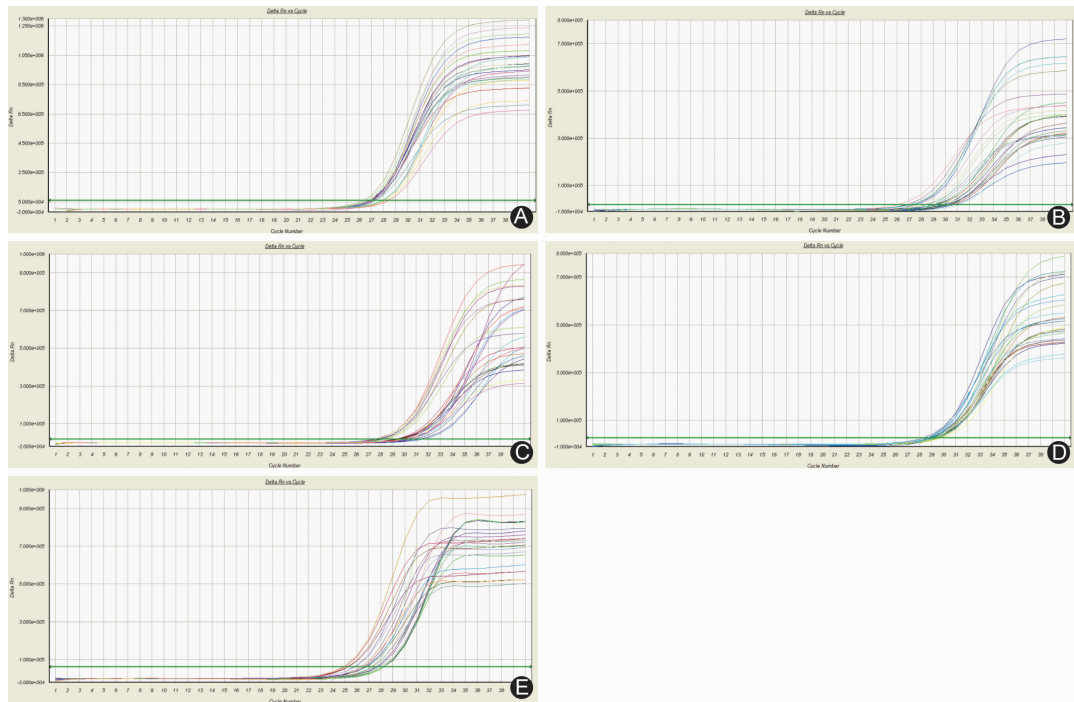


图 2 各组荷瘤鼠肿瘤组织 Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH、GSK3 mRNA 扩增曲线

双黄升白颗粒前期研究 20 余年,具有良好的临床疗效,前期研究发现,该药能促进骨髓造血干细胞的增殖与分化,具有改善造血微环境的作用^[5];本研究同样也显示了双黄升白颗粒能促进荷瘤鼠化疗骨髓抑制期造血干细胞增殖、提高骨髓有核细胞数量、升高白细胞数量。Sca-1 为小鼠造血干细胞标志物,CD34 为造血干/祖细胞标志物,双阳细胞能更好地代表造血

干细胞率高低。本研究中模型组双阳细胞比例高于正常组,考虑应用 CTX 后骨髓抑制,而停药后骨髓造血功能开始恢复,造血干细胞增殖加速,比例升高;而治疗组双阳细胞比例高于模型组,考虑为双黄升白颗粒能加速骨髓造血干细胞增殖,促进骨髓造血功能恢复。根据本研究结果,骨髓中 Wnt 各基因表达,考虑应用 CTX 后骨髓细胞增殖抑制,停药后则部分 Wnt 信号通

路基因表达上升,骨髓造血功能开始恢复性增殖加速,双黄升白颗粒则使得这种增殖加速更快更全面;肿瘤中 Wnt 各基因表达,考虑 CTX 停用后,Wnt 部分信号在肿瘤中表达升高,考虑肿瘤细胞增殖开始加速;而治疗组 Wnt 信号通路主要基因表达降低,考虑双黄升白颗粒对化疗骨髓抑制期肿瘤细胞增殖具有一定抑制作用。理论上化疗对骨髓红细胞系统及巨噬细胞系统(血小板来源)同样造成损伤,但由于红细胞及血小板寿命较白细胞长,本研究观察期较短,各组红细胞及血小板未见差异,考虑延长观察期或加大样本量,可以进一步阐明双黄升白颗粒对红细胞及血小板的影响。

前期对双黄升白颗粒的作用机制研究显示该药对细胞周期具有双重调控作用,在促进骨髓造血细胞生长同时能抑制肿瘤细胞生长^[3,4]。对 CyclinD1、Rb 等基因具有双重调控作用,而这些基因与 Wnt 信号通路具有密切的关系。Wnt 信号通路具有维持和增强 HSCs 自我更新和增殖的效果,可以通过活化骨髓基质细胞使造血微环境对造血干细胞产生应答,从而维持造血干细胞的自我更新^[10];阻断 Wnt 通路则可以抑制造血干细胞增殖和造血重建能力^[11]。其中 β -catenin 是经典 Wnt 信号途径关键的细胞内信号蛋白,表达不足可抑制 HSCs 分化增殖,过表达则会导致造血干细胞分化潜能和自我更新能力丧失^[12]。没有 Wnt 信号时, β -catenin 与 GSK3、DSH 组成复合物。当 Wnt 信号被激活后,Wnt 与跨膜受体 LRP5/6 以及 Frizzled 结合形成复合物,DSH-GSK3- β -Catenin 复合体解聚, β -catenin 进入胞核内,与转录因子 Lef/Tcf 结合,最终实现某个特定基因(如 C-Myc、CyclinD1)表达的增强或者减弱。本研究发现,双黄升白颗粒能上调荷瘤鼠化疗骨髓抑制期 Wnt 信号通路中主要信号 Wnt、 β -catenin、Frizzled、DSH、GSK3 在骨髓肿瘤的表达,结合骨髓有核细胞数、骨髓造血干细胞比例的增加,我们认为:双黄升白颗粒能促进骨髓细胞(包括骨髓造血干细胞)的增殖,促进骨髓抑制的恢复。值得注意的是,同期对肿瘤的研究我们发现,应用 CTX 后,荷瘤鼠肿瘤中 Wnt、 β -catenin、Frizzled 三者表达 mRNA 处于上调状态,即该阶段肿瘤细胞增殖理论上处于加速状态,应用双黄升白颗粒干预后,三者表达则明显下降,结合前期双黄升白颗粒能抑制肿瘤细胞细胞周期进行的研究结果,我们认为:双黄升白颗粒对化疗骨髓抑制期荷瘤鼠的肿瘤生长具有一定抑制作用。

综上所述,我们认为,双黄升白颗粒对荷瘤鼠化疗骨髓抑制具有良好的治疗效果,能促进骨髓造血干细

胞增殖,同时能抑制肿瘤细胞增殖,其作用机制与调控 Wnt 信号通路有关。

参 考 文 献

- [1] 徐振晔,朱晏伟,周卫东,等.双黄升白冲剂与粒-巨噬细胞集落刺激因子治疗化疗骨髓抑制 44 例临床研究[J].中医杂志,2003,44(12):919-921.
- [2] Xu ZY, Zhu YW, Zhou WD, et al. Clinical observation on effect of Shuanghuang Sengbai Granule on chemotherapy induced myelosuppression in tumor patients and on ultrastructure of bone marrow in mice[J]. Chin J Integr Med, 2001, 7(4): 277-281.
- [3] Gu X, Xu ZY, Zhu LY, et al. Dual control of Shuanghuang Shengbai Granule on cyclinD-CDK4/6 signal pathway of cell reproductive cycles in Lewis-bearing mice with cyclophosphamide-induced myelosuppression [J]. Oncol Targets Therapy, 2013, 6(1): 199-209.
- [4] 顾贤,徐振晔,王立芳,等.双黄升白颗粒双向调控细胞周期 CyclinD-CDK4/6 信号途径的进一步研究[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(12):32-35.
- [5] 王立芳,徐振晔,金长娟,等.双黄升白颗粒对化疗所致骨髓抑制 Lewis 肺癌荷瘤小鼠细胞周期的双重调控作用及其机制[J].中西医结合学报,2009,5(7):453-457.
- [6] 李春艳,王颖,刘浩,等.C_(57)BL/6 近交系小鼠 Lewis 肺癌动物模型:建设性描述肺癌损害程度的指标[J].中国组织工程研究,2003,7(26):3582-3583.
- [7] 中华人民共和国卫生部药政司.新药(西药)临床前研究指导原则汇编.1993:103.
- [8] 储真真,陈信义,孙韬,等.补肾生血方防治化疗血液学毒性反应临床观察[J].中华中医药杂志,2009,(4):542-543.
- [9] 胡志萍,甘宁,陈焕朝.补肾填精中药治疗老年晚期非小细胞肺癌化疗所致骨髓抑制的临床观察[J].四川中医,2010,28(8):73-75.
- [10] Kim JA, Kang YJ, Park G, et al. Identification of a stroma-mediated Wnt/beta-catenin signal promoting self-renewal of hematopoietic stem cells in the stem cell niche[J]. Stem Cells, 2009, 27(6): 1318-1329.
- [11] Malhotra S, Kincade PW. Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(1): 27-36.
- [12] Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, et al. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block [J]. Nat Immunol, 2006, 7(10): 1048-1056.

(收稿:2015-06-10 修回:2016-10-25)