

益气养阴方及其拆方对急性髓系白血病细胞细胞凋亡及 Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo, AIF 表达的影响

张树森¹, 徐瑞荣^{2*}, 王兆华³, 王琰²

(1. 山东中医药大学, 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014;
3. 山东省农业科学院农产品研究所, 济南 250100)

[摘要] **目的:**研究益气养阴方及其拆方后的扶正方、祛邪方对人急性髓系白血病细胞凋亡及细胞色素 C (Cytochrome C, Cyt-C), 凋亡蛋白酶活化因子 (apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1), 第二个线粒体衍生的半胱天冬蛋白酶激活因子 (the second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI, Smac/Diablo), 凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factors, AIF) 表达的影响, 探讨益气养阴方治疗白血病的可能作用机制。**方法:**采用 NOD/SCID 小鼠, 以 KG-1a 细胞株建立人急性髓系白血病模型, 随机分为全方组、祛邪组、扶正组和空白组, 取 NOD/SCID 小鼠脾细胞制成细胞悬液, 应用流式细胞术检测 NOD/SCID 小鼠细胞凋亡率; 采用免疫组化法检测 NOD/SCID 小鼠骨髓中线粒体相关凋亡因子 Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo 和 AIF 的表达。**结果:**用药后, 用药组小鼠生存时间较空白组显著延长 ($P < 0.01$), 全方组小鼠生存时间较扶正组与祛邪组显著延长 ($P < 0.01$), 祛邪组小鼠生存时间较扶正组显著延长 ($P < 0.01$)。用药组细胞凋亡率较空白组明显升高 ($P < 0.01$), 全方组较扶正组与祛邪组显著升高 ($P < 0.01$), 祛邪组较扶正组显著升高 ($P < 0.01$)。用药组小鼠骨髓中 Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo, AIF 的表达较空白组显著升高 ($P < 0.05$), 其中 Cyt-C 与 Apaf-1 表达显著升高 ($P < 0.01$); 全方组均高于扶正组与祛邪组 ($P < 0.01$); 祛邪组较扶正组均升高 ($P < 0.05$), Cyt-C, Apaf-1 和 Smac/Diablo 表达显著升高 ($P < 0.01$)。其中对于各指标的影响全方组均优于扶正组与祛邪组, 祛邪组均优于扶正组。**结论:**益气养阴方能够提高 NOD/SCID 小鼠的细胞凋亡率, 上调线粒体相关凋亡因子 Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo, AIF 的表达, 并诱导其凋亡, 抑制白血病细胞增殖, 其机制可能与线粒体凋亡通路有关。

[关键词] 急性髓系白血病; 益气养阴方; KG-1a 细胞; 线粒体途径; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0095-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050095

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1428.070.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 14:28

Effect of Yiqi Yangyin Recipe and Its Separated Recipes on Apoptosis Rate and Expression of Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo, AIF in Acute Myeloid Leukemic Mice

ZHANG Shu-sen¹, XU Rui-rong^{2*}, WANG Zhao-hua³, WANG Yan²

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250014, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250014, China;

3. Agricultural Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the action mechanism of Yiqi Yangyin recipe with supplementing Qi and nourishing Yin) in treating leukemia by observing the effects of Yiqi Yangyin recipe and its separated recipes on expressions of Cytochrome C (Cyt-C), apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), the second

[收稿日期] 20150527(018)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473511, 81173442); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2013WS0249)

[第一作者] 张树森, 硕士, 从事中西医结合防治血液肿瘤的研究, Tel: 15216440536, E-mail: 963989936@qq.com

[通讯作者] * 徐瑞荣, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合防治血液肿瘤的研究, Tel: 13793188175, E-mail: xrr18@sina.com

mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI (Smac/Diablo), apoptosis-inducing factors (AIF) in acute myeloid leukemic cells. **Method:** NOD/SCID mice were taken as the research platform and injected with KG-1a cells through tail vein to establish the model of human acute myeloid leukemia. The model mice were randomly divided into Quanfang group, Fuzheng group, Quxie group and control group. The spleen cell suspensions of NOD/SCID mice were prepared to measure the cell apoptosis rates by flow cytometry. The immunohistochemistry was used to detect the expression of the mitochondrial-related apoptosis factors in bone marrow of mice, including Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo and AIF. **Result:** After treatment, the survival time of treatment groups were significantly longer than that of control group ($P < 0.01$), the survival time of Quanfang group mice were longer than that of Fuzheng group and Quxie group ($P < 0.01$), the survival time of Quxie group mice were longer than that of Fuzheng group mice ($P < 0.01$). The cell apoptosis rate in all treatment groups was significantly higher than that of control group ($P < 0.01$), the cell apoptosis rate of Quanfang group were higher than that of Fuzheng group and Quxie group ($P < 0.01$), and the cell apoptosis rate of Quxie group were higher than that of Fuzheng group ($P < 0.01$). With respect to the expressions of Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo and AIF in bone marrow of mice, the treatment groups were higher than control group ($P < 0.05$), particularly Cyt-C and Apaf-1 ($P < 0.01$). All of the above expressions of Quanfang group were higher than those of Fuzheng group and Quxie group ($P < 0.01$). Quxie group was higher than Fuzheng group ($P < 0.05$), particularly Cyt-C, Apaf-1 and Smac/Diablo ($P < 0.01$). In terms of the effect on each tested indicator, Quanfang group was better than Fuzheng group and Quxie group, and Quxie group was better than Fuzheng group. **Conclusion:** Yiqi Yangyin recipe can increase the cell apoptosis rate in NOD/SCID, improve the expression of the mitochondrial-related apoptosis factors Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo and AIF, induce apoptosis of leukemia cells and inhibit the proliferation of leukemia cells, which may be associated with the mitochondrial apoptosis pathway.

[**Key words**] acute myeloid leukemia; Yiqi Yangyin recipe; KG-1a cell; mitochondrial pathway; apoptosis

急性髓系白血病的研究多集中在临床经验,近几年来,转向针对中药单体或复方,研究中医药治疗急性髓系白血病在细胞毒作用、免疫调节作用和促诱导分化作用方面的机制,越来越多的证据显示肿瘤的发生发展与线粒体的结构和功能的异常改变密切相关^[1-2]。有研究认为,细胞凋亡受阻与白血病的发生密切相关,线粒体可以决定细胞的生存或死亡^[3-4]。其中线粒体凋亡因子细胞色素 C (Cytochrome C, Cyt-C), 凋亡蛋白酶活化因子 (apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1), 第二个线粒体衍生的半胱天冬蛋白酶激活因子 (the second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI, Smac/Diablo), 凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factors, AIF) 的表达在细胞线粒体凋亡过程中有非常重要的作用,在前期实验中,已研究了益气养阴方及其拆方对急性髓系白血病小鼠骨髓细胞 hTERT 及其启动子甲基化表达、细胞周期、细胞凋亡及相关蛋白的影响^[5-7]。故本研究继续选取山东中医药大学附属医院血液科创始人顾振东教授治疗急性白血病 40 年的益气

养阴方,并将其拆分为扶正方和祛邪方,分别采用 KG-1a 细胞株在 NOD/SCID 小鼠上建立的人急性髓系白血病模型,研究益气养阴方及其拆方对人急性髓系白血病细胞细胞凋亡及 Cyt-C, Apaf-1, Smac / Diablo, AIF 表达的影响,探讨益气养阴方在线粒体方面促使急性髓系白血病细胞凋亡,达到治疗急性髓系白血病的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物及细胞株 SPF 级雄性 NOD/SCID 小鼠, 4 周龄, 体重 19 ~ 22 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2014-0004, 饲养于山东弘立医学动物实验研究有限公司 SPF 级动物房, 经山东中医药大学伦理委员会批准, 符合实验动物伦理委员会研究指导原则。常规适应性饲养 7 d 后进行实验。KG-1a 细胞株由山东省医学科学院惠赠, 常规培养在含 20% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中, 培养于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中, 2 ~ 3 d 换液传代 1 次。

1.2 试剂 DMEM 高糖培养基, 磷酸盐缓冲液 (PBS, 美国 Hyclone 公司, 批号分别为 NAD1364,

AAE202904); 胎牛血清(美国 Gibco 公司, 批号 1414426); 小鼠脾脏组织淋巴细胞分离液试剂盒(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司, 批号 LTS1092PK); Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI) 细胞凋亡检测试剂盒(上海 BestBio 公司, 批号 401001); SP-9000 生物素-链酶卵白素免疫组化检测试剂盒, DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 K147715E, 15111A06); Anti-Cyt-c antibody, Anti-Apaf-1 antibody, Anti-Smac/Diablo antibody, Anti-AIF antibody[艾博抗(上海)贸易有限公司, 批号分别为 ab133504, ab32372, ab32023, ab32516]。

1.3 仪器 MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司), SW-CJ-1F 型超净工作台(苏州安泰技术有限公司), Conto II BD 型流式细胞仪(美国 BD 公司), IX71 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.4 药物 益气养阴方: 黄芪 30 g, 白花蛇舌草 30 g, 太子参 30 g, 女贞子 10 g, 白术 10 g, 黄精 15 g, 墨旱莲 10 g, 茯苓 10 g, 地黄(生) 15 g, 半枝莲 30 g, 麦冬 15 g, 蒲公英 30 g, 天冬 15 g, 小蓟 30 g, 甘草 10 g; 祛邪方: 地黄(生) 15 g, 白花蛇舌草 30 g, 半枝莲 30 g, 蒲公英 30 g, 小蓟 30 g; 扶正方: 黄芪 30 g, 太子参 30 g, 女贞子 10 g, 白术 10 g, 黄精 15 g, 麦冬 15 g, 茯苓 10 g, 天冬 15 g, 墨旱莲 10 g, 甘草 10 g。饮片均由山东中医药大学附属医院药学部主任药师马传江鉴定为正品。上述 3 组方药分别浓缩到 145 mL(生药含量约 2 g·mL⁻¹), 130 mL(生药含量约 1.19 g·mL⁻¹), 130 mL(生药含量约 1.06 g·mL⁻¹), 全部经高温高压灭菌之后, 4 ℃ 保存。

2 方法

2.1 细胞培养 调整水箱温度至 37 ℃, 取冻存细胞迅速置于 37 ℃ 中, 轻轻晃动使其融化, 用酒精棉球擦拭冻存管表面, 于超净台操作, 小心吸出细胞悬液加入含完全培养基 10 mL 的离心管中混匀, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃掉上清液, 加入培养基重悬混匀, 转至细胞培养瓶中于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养至细胞对数生长期时应用于动物造模。

2.2 造模建立 参照李蓉蔚等^[8] 建立急性髓系白血病干细胞 NOD/SCID 小鼠白血病模型及模型鉴定的方法进行动物造模, 将 NOD/SCID 小鼠经⁶⁰Co(山东省辐照中心) 全身照射后 12 h 内, 取处于对数生长期的 KG-1a 细胞离心, 弃去上层培养液, PBS 洗 2 次后重悬于生理盐水中, 调整细胞密度为 3 × 10⁷ 个/mL, 取细胞 0.2 mL 通过小鼠尾静脉注射, 建立模型。

2.3 动物分组及用药 取接种 1 周后的 NOD/SCID 小鼠 48 只随机分为 4 组, 每组 12 只, 分别为全方组、祛邪组、扶正组和空白组, 给药剂量根据《药理实验方法学》^[9] 3 版药理实验设计中剂量进行换算, 全方组、祛邪组、扶正组分别予益气养阴方全方药液(16 g·kg⁻¹), 祛邪方药液(9.52 g·kg⁻¹), 扶正方药液(8.48 g·kg⁻¹) 灌胃, 空白组灌胃生理盐水。各组均每天给药 0.2 mL, 共用药 4 周。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 脱颈处死小鼠, 取脾组织研磨, 经 PBS 洗后离心重悬制备成脾细胞悬液, 加入等量分离液, 室温 2 000 r·min⁻¹ 离心 20 min; 离心后分为 4 层, 小心吸取第二层淋巴细胞层到另一离心管中; 加入清洗液洗 3 次, 加入 1 × Annexin V 结合液 400 μL 重悬细胞; 加入 Annexin V-FITC 染色液 5 μL, 轻轻混匀后于 4 ℃ 孵育 15 min; 加入 PI 染色液 10 μL, 混匀, 于 4 ℃ 孵育 5 min; 立即用流式细胞仪检测。

2.5 免疫组化法检测 Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo 和 AIF 蛋白表达 处死小鼠用酒精浸泡消毒后, 取出其股骨和胫骨, 将两头慢慢剪开至露出髓腔, 用 PBS 缓冲液 5 mL 从一头注射将其骨髓冲出为一条状, 避免病理脱钙时小鼠骨髓造成的损伤, 小心转移到 10% 中性甲醛中固定 24 h 以上, 脱水、透明、浸蜡、包埋、切片, 脱蜡至水, 经抗原修复后, 滴加 3% H₂O₂ 避光孵育 5 min, 加试剂 A, 常温孵育 10 min; 迅速加一抗(Cyt-C, Smac/Diablo, AIF 1:250; Apaf-1 1:50), 常温孵育 2 h, 加试剂 B, 常温孵育 10 min, 加试剂 C, 常温孵育 10 min, 加入 DAB 缓冲液, 出现棕黄色时, 用自来水冲洗, 终止染色, 将终止染色后的切片进行轻度复染后分化, 脱水, 透明, 封片。倒置相差荧光显微镜下观察, 采集 3 个光镜视野进行拍照保存, 在相同条件下, 使用软件 Image-Pro Plus 6.0 分析吸光度 A/图像映射中的区域(area) 的平均值。

2.6 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计软件, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较差异性时用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 益气养阴方及其拆方对 NOD/SCID 小鼠细胞凋亡的影响 用药 4 周后, 用药组细胞凋亡率较空白组显著升高($P < 0.01$), 全方组细胞凋亡率显著高于扶正组与祛邪组($P < 0.01$), 祛邪组细胞凋亡率较扶正组显著升高($P < 0.01$), 益气养阴方及其拆方能够诱导 KG-1a 细胞的早期凋亡, 其中益气养

阴方的作用更明显。见表 1。

表 1 益气养阴方及其拆方对 NOD/SCID 小鼠早期凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of Yiqi Yangyin recipe and its separated recipes on NOD/SCID mice in early apoptosis rate ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	早期凋亡率/%
全方	16	23.72 ± 1.78 ^{1,2)}
祛邪	9.52	19.74 ± 3.77 ^{1,3)}
扶正	8.48	14.33 ± 2.07 ¹⁾
空白	-	6.23 ± 1.08

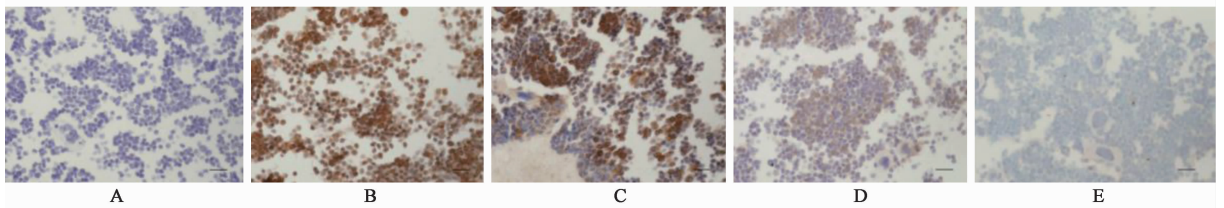
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与扶正组或祛邪组比较²⁾ $P < 0.01$;与扶正组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 NOD/SCID 小鼠骨髓中 KG-1a 细胞中线粒体相关凋亡因子蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Expression of mitochondria-related apoptotic factors in KG-1a cells in NOD/SCID mice bone marrow ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Cyt-C	Apaf-1	Smac/Diablo	AIF
全方	16	20.93 ± 2.58 ^{2,3,5)}	6.50 ± 0.99 ^{2,3,5)}	9.13 ± 3.2.09 ^{1,3,5)}	13.27 ± 3.89 ^{1,3,5)}
祛邪	9.52	18.35 ± 2.03 ^{2,5)}	4.84 ± 0.53 ^{2,5)}	6.08 ± 1.89 ^{1,5)}	10.45 ± 1.88 ^{1,4)}
扶正	8.48	8.70 ± 0.84 ²⁾	3.68 ± 0.74 ²⁾	4.11 ± 1.02 ¹⁾	8.44 ± 1.09 ¹⁾
空白	-	3.94 ± 0.55	3.04 ± 0.66	2.65 ± 0.64	3.74 ± 1.16

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与祛邪组比较³⁾ $P < 0.01$;与扶正组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ 。



A. 阴性对照组; B. 全方组; C. 祛邪组; D. 扶正组; E. 空白组(图 2~4 同)

图 1 益气养阴方及其拆方对 Cyt-C 蛋白表达的影响(免疫组化, ×640)

Fig. 1 Effect of Yiqi Yangyin recipe and its separated recipes on expression of Cyt-C(IHC, ×640)

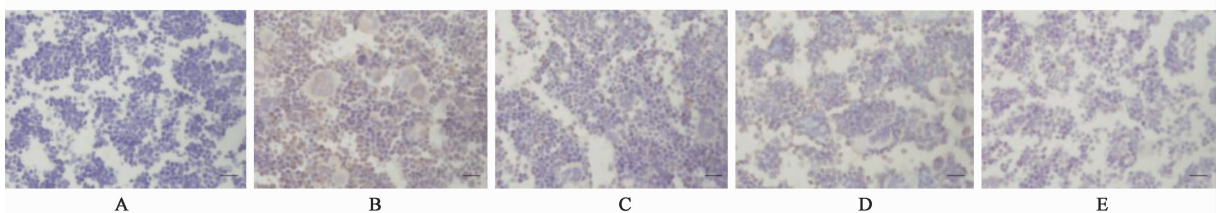


图 2 益气养阴方及其拆方对 Apaf-1 蛋白表达的影响(免疫组化, ×640)

Fig. 2 Effect of Yiqi Yangyin recipe and its separated recipes on expression of Apaf-1(IHC, ×640)

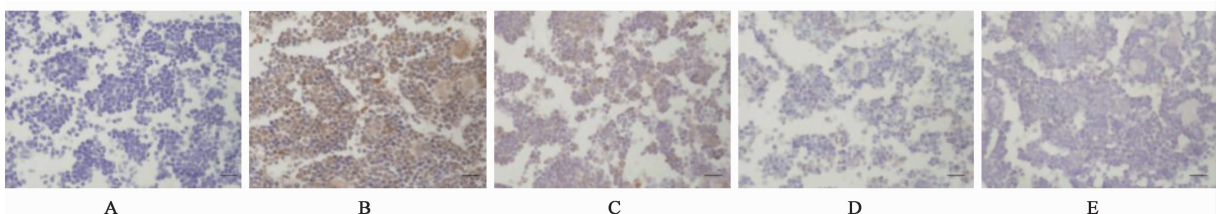


图 3 益气养阴方及其拆方对 Smac/Diablo 蛋白表达的影响(免疫组化, ×640)

Fig. 3 Effect of Yiqi Yangyin recipe and its separated recipes on expression of Smac/Diablo(IHC, ×640)

3.2 益气养阴方及其拆方对 NOD/SCID 小鼠骨髓 KG-1a 细胞线粒体相关凋亡因子的影响 用药 4 周后,益气养阴方组 Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo, AIF 表达均较空白组明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),其中 Cyt-C 与 Apaf-1 表达显著升高 ($P < 0.01$);全方组上述指标均显著高于扶正组与祛邪组 ($P < 0.01$);祛邪组 AIF 明显高于扶正组 ($P < 0.05$),其中 Cyt-C, Apaf-1 和 Smac/Diablo 表达显著高于扶正组 ($P < 0.01$)。益气养阴方及其拆方能够提高线粒体相关凋亡因子的表达,其中益气养阴方全方的作用更明显。见表 2,图 1~4。

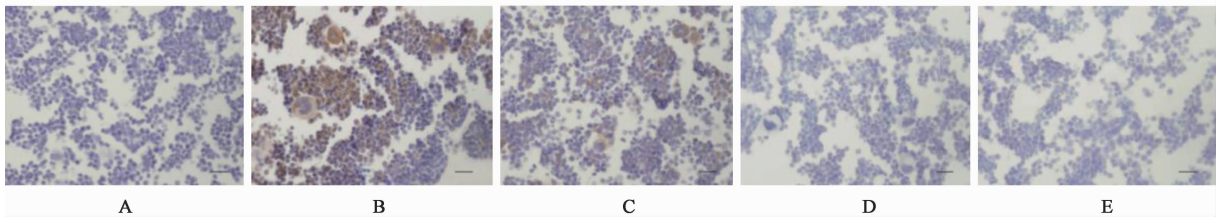


图 4 益气养阴方及其拆方对 AIF 蛋白表达的影响(免疫组化, ×640)

Fig. 4 Effect of Yiqi Yangyin recipe and its separated recipes on expression of AIF(IHC, ×640)

4 讨论

机体通过凋亡将衰老、畸变和致病的细胞清除,维持细胞内环境稳定和正常的生理状态。近年来,研究发现除细胞核之外,线粒体是与细胞凋亡密切相关的一个重要细胞器。线粒体膜间腔内发现有很多种能够启动细胞凋亡的因子,是促进细胞凋亡信号传导分子的靶点,同时也是细胞死亡通路的整合元件,其介导的凋亡相关因子主要包括 Cyt-C, AIF, Smac/Diablo, Apaf-1, 半胱天冬蛋白酶(Caspase), Bcl 蛋白家族(Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bid, Bim)及热休克蛋白(Hsp-10, Hsp-60)等。

Cyt-c 是于 1996 年王晓东小组首先提出的在细胞凋亡过程中的起重要作用的因子^[10],通过 Caspase 依赖途径来诱导细胞凋亡^[11],线粒体受到损伤后,Cyt-C 从线粒体释放到细胞浆中,与 Apaf-1 结合,聚集 proCaspase-9,形成 Cyt-c, Apaf-1 和 proCaspase-9 三者的复合物,即“凋亡复合体”,激活后的 proCaspase-9 再激活下游的 Caspase 效应子 proCaspase-3, proCaspase-6 和 proCaspase-7,这些蛋白酶通过多种途径发挥作用,最终导致细胞凋亡^[12]。其中,Cyt-C 作为凋亡起始因子在细胞凋亡的启动中,发挥着至关重要的作用。石静等^[13]通过研究穿心莲内酯,得出其诱导 HL-60 细胞凋亡机制可能与线粒体 Cyt-C 凋亡通路有关。王皓^[14]通过发现氯化汞可以改变 Cyt-C 的表达,诱导 NB4 和 K562 白血病细胞发生凋亡。

Apaf-1 为线粒体凋亡的调节蛋白,是重要的肿瘤抑制基因,是凋亡复合体的核心,在凋亡复合体的形成过程中起关键作用,其表达升高可恢复肿瘤细胞凋亡的敏感性,而其表达减少及缺失则可能与白血病的发生发展或复发相关^[15]。ZANG 等^[16]通过实验研究得出 Apaf-1 基因表达下调与肺癌发生密切相关。宫颈癌研究结果证明去甲基化作用可重新激活 Apaf-1^[17]。

Smac/Diablo 在受到凋亡刺激时,从线粒体跨膜释放到细胞质中,与凋亡抑制蛋白(Inhibitors of

apoptosis proteins, IAPs) 包括 XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Survivin, livin 的 BIR 结构域发生特异性结合,解除了 IAPs 的抑制作用,进而释放活化的 Caspases,促进了细胞凋亡^[18-20]。目前发现 Smac/Diablo 在治疗肿瘤疾病的过程中有重要作用,而其凋亡的作用并不破坏正常细胞,只针对肿瘤细胞发生作用。宏峰等^[21]研究得出 Smac/Diablo 能够促进胰腺癌 AW1990 细胞凋亡,并且能够增加对化疗药物的敏感性,减轻化疗毒性,提高化疗作用;邓德厚等^[22]推测出华蟾素可以促进肝癌细胞凋亡,而其机制为提高了 Smac/Diablo 蛋白的表达,使肝癌细胞生长受到抑制,达到抗肿瘤的效果。

AIF 受到凋亡刺激后,线粒体膜通透性增加,其被分割成多种氨基酸,产生成熟的促凋亡蛋白,被释放到细胞质,再转移到细胞核,导致 DNA 断裂^[23-26]。AIF 诱导凋亡的机制不依赖 Caspases 和细胞质凋亡相关因子,一方面转运到细胞核调节染色质压缩和 DNA 降解,同时抑制细胞生成抑制因子的表达;另一方面激活易位酶,释放凋亡信号,从而促使细胞发生凋亡。研究表明,AIF 诱导肿瘤细胞凋亡方面起到关键的作用^[26-27]。

由此看来,线粒体介导的凋亡相关因子是调控细胞凋亡过程的重要参与者,其与白血病的发生密切相关,因此通过“线粒体通路”促进白血病细胞的凋亡可作为研究白血病治疗的主要途径之一,而其中以研究线粒体介导的相关凋亡因子作为靶点寻求治疗白血病的靶向药物提供了研究方向。

本研究结果显示,通过治疗后,细胞凋亡率明显升高,推测可能是经药物治疗后,提高了线粒体相关凋亡因子 Cyt-C, Apaf-1, Smac/Diablo, AIF 的表达,致使 KG-1a 细胞通过线粒体的途径发生凋亡,从而起到治疗白血病的作用,其中益气养阴方全方较扶正或祛邪药物诱导细胞凋亡的作用更强。

[参考文献]

[1] Ryan F P. An alternative approach to medical genetics based on modern evolutionary biology. Part 1: mutation

- and symbiogenesis [J]. *J R Soc Med*, 2009, 102(7): 272-277.
- [2] Ralph S J, Neuzil J. Mitochondria as targets for cancer therapy [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(1): 9-28.
- [3] Adrain C, Martin S J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(6): 390-397.
- [4] Velde C V, Cizeau J, Dubik D, et al. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(15): 5454-5468.
- [5] 徐瑞荣, 焦宁, 陈冲, 等. 益气养阴方及其拆方对急性髓细胞白血病小鼠骨髓细胞 hTERT 及其启动子甲基化表达的影响 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(1): 57-60.
- [6] 焦宁, 陈冲, 徐瑞荣. 益气养阴方及其拆方对急性髓细胞白血病细胞周期及相关蛋白的调控研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(4): 730-732.
- [7] 焦宁, 陈冲, 徐瑞荣. 益气养阴方及其拆方对急性髓细胞白血病小鼠细胞凋亡及相关蛋白的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(2): 42-45.
- [8] 李蓉蔚, 王诗韵, 董慧娟, 等. 急性髓系白血病干细胞 NOD/SCID 小鼠白血病模型的建立 [J]. *生物医学工程与临床*, 2013, 17(3): 213-217.
- [9] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 202-204.
- [10] LIU X, Kim C N, YANG J, et al. Induction of apoptotic program in cell free extracts; requirement for dATP and cytochrome C [J]. *Cell*, 1996, 86(1): 147-157.
- [11] Singh M H, Brooke S M, Zemlyak I, et al. Evidence for caspase effects on release of cytochrome C and AIF in a model of ischemia in cortical neurons [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 469(2): 179-183.
- [12] YU X, WANG L, Acehan D, et al. Three-dimensional structure of a double apoptosome formed by the Drosophila Apaf21 related killer [J]. *J Mol Biol*, 2006, 355(3): 577-589.
- [13] 石静, 梁勇刚. 穿心莲内酯对 HL-60 细胞凋亡、Cyt-C 蛋白表达的影响 [J]. *中国民族民间医药*, 2015, 22(22): 22-24.
- [14] 王皓. 氯化汞对白血病的治疗作用及其作用机制的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [15] 郭军. Apollon 表达在成人急性白血病发生发展中的意义 [D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [16] ZANG Y S, ZHONG Y F, FANG Z, et al. MiR-155 inhibits the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin via negative regulation of Apaf-1 expression [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(11): 773-778.
- [17] YAO T T, MO S M, LIU L Y, et al. 5-Aza-2-deoxycytidine may influence the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells via demethylation in a dose-and time-dependent manner [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(1): 312-318.
- [18] DAI C H, LI J, Shis S B, et al. Survivin and Smac gene expressions but not Livin are predictors of prognosis in nonsmall cell lung cancer patients treated with adjuvant chemotherapy following surgery [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40(4): 327-335.
- [19] Dardinu M, Feltham R, Tenev T, et al. Molecular determinants of Smac mimetic induced degradation of cIAP1 and cIAP2 [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(8): 1376-1386.
- [20] HUI K K, Kanungo A K, Elia A J, et al. Caspase-3 deficiency reveals a physiologic role for Smac/DIABLO in regulating programmed cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(11): 1780-1790.
- [21] 宏峰, 曾淑媛, 钟碧青. Smac/DIABLO 对胰腺癌 SW1990 细胞凋亡及化疗敏感性的影响 [J]. *实用药物与临床*, 2016, 19(2): 140-143.
- [22] 邓德厚, 史华, 张永军, 等. 华蟾素注射液对小鼠肝癌组织 Smac 及 Caspase-9 表达的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2015, 22(3): 153-158.
- [23] Miseviciene L, Anusevicius Z, Sarlauskas J, et al. Redox reactions of the FAD-containing apoptosis-inducing factor (AIF) with quinoidal xenobiotics: a mechanistic study [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 512(2): 183-89.
- [24] Scovassi A I, Soldani C, Veneroni P, et al. Changes of mitochondria and relocation of the apoptosis-inducing factor during apoptosis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1171: 12-17.
- [25] Hangen L, Blomgren K, Benit P, et al. Life with or without AIF [J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(5): 278-287.
- [26] DING Z J, CHEN X, TANG X X, et al. Calpain inhibitor PD150606 attenuates glutamate induced spiral ganglion neuron apoptosis through apoptosis inducing factor pathway *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123130.
- [27] 谢丹, 林源, 杨阿莉. 大黄素抑制人肝癌裸鼠移植瘤生长机制探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2015, 22(1): 28-33.
- [28] 张睿, 崔雨婷, 陈正礼, 等. 线粒体凋亡相关因子在大鼠自发性乳腺肿瘤中的表达 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(4): 375-381.

[责任编辑 张丰丰]