

· 临床 ·

从 p38MAPK 通路探讨复方参鹿颗粒对较低危 MDS 骨髓患者 CD34⁺ 细胞凋亡的影响

张旭峰, 赵琳*, 徐培

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的:从 p38 有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路研究复方参鹿颗粒(FSG)对较低危骨髓增生异常综合征(lower-risk MDS)骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡的影响。方法:将 60 例 lower-risk MDS 患者随机分为 FSG 组和安特尔治疗组,每组 30 例。干预 3 个月。观察治疗前后两组患者血常规、骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡率、骨髓单个核细胞(BMMNC)磷酸化 p38(p-p38), p38, 丝裂原活化蛋白激酶激酶(MKK)3/6, 磷酸化 p53(p-p53), B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 家族相关基因(Bcl-xl)蛋白以及 p38 mRNA 表达的变化。对照组 7 例为年龄匹配的非 MDS 引起的血细胞减少患者。结果:与治疗前比较, FSG 组治疗后红细胞计数、血红蛋白量、血小板明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$);安特尔组治疗后血红蛋白量有上升趋势,白细胞、红细胞、血小板计数差异无统计学意义。与对照组比较,治疗前 FSG 组 lower-risk MDS 骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡率, p-p38, MKK3/6, p-p53 蛋白表达增加, Bcl-xl 蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), p38, Bcl-2 蛋白和 p38 mRNA 表达无差异; FSG 治疗后, CD34⁺ 细胞凋亡率, p-p38, MKK3/6, p-p53 蛋白表达均降低($P < 0.05$), 但 p-p38 蛋白表达仍高于对照组($P < 0.05$), Bcl-xl 蛋白表达增高($P < 0.05$)。安特尔组治疗前后 CD34⁺ 细胞凋亡率, p-p38, MKK3/6, p-p53, Bcl-xl 蛋白表达差异均无统计学意义。对照组, lower-risk MDS 患者治疗前骨髓 p-p38 蛋白表达和 CD34⁺ 细胞凋亡率呈正相关($P < 0.01$)。FSG 组治疗后骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡率下降与 p-p38 蛋白表达水平下降呈正相关($P < 0.01$)。结论: FSG 通过调控 p38MAPK 通路抑制骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡, 改善骨髓无效造血。

[关键词] 骨髓增生异常综合征; p38 有丝分裂原活化蛋白激酶; 复方参鹿颗粒; 细胞凋亡率

[中图分类号] R287; R259 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0152-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160152

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1146.062.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 11:46

Effect of Compound Shenlu Granule on Apoptosis of CD34⁺ Cells in Lower-risk MDS Bone Marrow Based on p38MAPK Pathway

ZHANG Xu-feng, ZHAO Lin*, XU Pei

(Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of compound Shenlu granule (FSG) on the apoptosis of CD34⁺ cells of lower-risk myelodysplastic syndromes (MDS) bone marrow based on p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. **Method:** The 60 patients with lower-risk MDS patients were randomly divided into FSG group and andriol treatment group, 30 cases in each group. All of the patients were treated for 3 months. Changes of blood routine, rates of apoptosis of CD34⁺ cells, p-p38, p38, mitogen activated protein kinase kinase (MKK) 3/6, p-p53, Bcl-xl, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein and p38 mRNA expression levels in bone marrow

[收稿日期] 20170110(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403233)

[第一作者] 张旭峰, 主管检验师, 从事血液病基因检测研究, Tel:021-53827210, E-mail: yanghuating@sina.com

[通讯作者] * 赵琳, 博士, 副主任医师, 从事中医药防治血液病研究, Tel:021-53827352, E-mail: zhaolin131@aliyun.com

mononuclear cells (BMMNC) were observed before and after treatment. 7 cases from control group were age-matched patients with non-MDS cytopenia. **Result:** After treatment, the red blood cells count, platelet count and hemoglobin count were increased in FSG group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); hemoglobin count was increased in Andriol group after treatment and there was no significant difference in the count of WBC, RBC and PLT. As compared with control group, apoptosis rate of CD34⁺ cells and expression levels of p-p38, MKK3/6, p-p53 protein were higher, and expression of Bcl-xl was lower in FSG group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); while there was no significant difference in p38, Bcl-2 protein expression and p38 mRNA expression. After FSG treatment, CD34⁺ cell apoptosis rate and levels of p-p38, MKK3/6, p-p53 protein expression in FSG group were lower ($P < 0.05$), p-p38 and Bcl-xl protein expression levels were higher than those in control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the apoptosis rate of CD34⁺, p-p38, MKK3/6, p-p53, Bcl-xl protein expression in Andriol group before and after treatment. P-p38 protein expression and CD34⁺ cell apoptosis rate were positively correlated before treatment in control group ($P < 0.01$), and the decrease in apoptosis rate of CD34⁺ was positively correlated with decrease in p-p38 protein expression after treatment in FSG group. **Conclusion:** FSG could inhibit the apoptosis of bone marrow CD34⁺ cells by regulating the p38MAPK pathway, and improve the ineffective hematopoiesis of bone marrow.

[**Key words**] myelodysplastic syndromes; p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK); compound Shenlu granule; cell apoptosis

骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS) 是一组以无效造血和高风险向急性髓系白血病转化为特征的异质性克隆性疾病。随着人口的老齡化, MDS 的发病率呈上升趋势。在 65 岁以上人群, 年发病率可达 75 人/10 万人, 是老年人最常见的血液系统恶性肿瘤之一^[1]。约 70% 的 MDS 是以无效造血为特点、难治性血细胞减少为主要临床表现的较低危 MDS (lower-risk MDS)^[2]。西医学缺乏有效的治疗手段。理论上异基因骨髓移植是唯一能治愈 MDS 的方法, 但受 MDS 发病年龄较大、合适供体缺乏等因素限制, 绝大多数 MDS 患者无移植机会。大量研究证实, 骨髓 CD34⁺ 细胞的过度凋亡是 lower-risk MDS 的主要特征。近期研究发现, 骨髓基质细胞和 MDS 克隆细胞过度产生的多种造血抑制因子, 通过共同的 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路诱导骨髓造血细胞凋亡, 是引起 lower-risk MDS 骨髓无效造血的重要病理机制^[3]。复方参鹿颗粒 (compound Shenlu granule, FSG) 为曙光医院血液科已故吴翰香老先生的经验方, 作为本院院内制剂 (沪药制字 Z06100005) 用于临床 20 余年, 疗效肯定。前期的临床研究发现 FSG 能减少 MDS 造血抑制因子的产生, 改善骨髓无效造血^[4], 但其作用途径未明确。因此, 本研究拟从 p38MAPK 信号通路, 探讨 FSG 改善 lower-risk MDS 骨髓无效造血的作用机制, 为临床应用提供科学

依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 经上海中医药大学附属曙光医院伦理委员会 (批号 2014-124) 批准, 选择 2015 年 1 月—2016 年 12 月在本院血液科就诊的 lower-risk MDS 患者 60 例, 随机分为 FSG 组和安特尔组, 各 30 例。FSG 组男 18 例, 女 12 例; 年龄 25 ~ 79 岁, 平均 (53.9 ± 16.5) 岁; 其中难治性贫血伴环形铁粒幼细胞细胞增多 (RARS) 1 例, 难治性中性粒细胞减少 (RN) 1 例, 难治性血细胞减少伴多系发育异常 (RCMD) 28 例; 国际预后评分系统 (IPSS) 积分 25 例为 0.5, 5 例为 1; 安特尔组男 19 例, 女 11 例; 年龄 18 ~ 80 岁, 平均 (59.1 ± 17.8) 岁; 其中 RARS 1 例, 难治性贫血 (RA) 1 例, RCMD 28 例; IPSS 积分 1 例为 0, 25 例为 0.5, 4 例为 1。2 组患者的性别、年龄、血象, IPSS 积分比较差异均无统计学意义, 具有可比性。FSG 组 29 例完成 3 个月的治疗, 1 例失访; 安特尔组则为 28 例, 1 例疾病进展为急性髓细胞白血病, 1 例失访。对照组 7 例为年龄匹配的非 MDS 引起的血细胞减少患者, 其中缺铁性贫血 1 例, 巨幼细胞性贫血 2 例, 急性髓细胞白血病 2 例, 再生障碍性贫血 2 例。

1.2 诊断标准 MDS 诊断标准^[5] 采用维也纳最低诊断标准。MDS 分型标准采用 2008 年世界卫生组织 (WHO) 分型诊断标准。预后分组采用 MDS IPSS, 低危 (low), IPSS 为 0 分; 中危-1 (Int-1), IPSS

0.5 ~ 1 分。肾阳虚证诊断标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[6]中肾阳虚证的诊断标准。

1.3 纳入和排除标准 纳入标准,①符合 MDS 诊断标准;②符合 2008 年 WHO 难治性血细胞减少伴单系发育异常、难治性贫血伴环状铁粒幼红细胞、难治性血细胞减少伴多系发育异常分型诊断标准;③IPSS ≤ 1.0 分;④中医辨证属肾阳虚证;⑤半年内未用其他任何可能对造血功能有影响的药物;⑥年龄 18 ~ 80 岁;⑦患者知情同意,并签署知情同意书。

排除标准,①有明显兼夹证或合并证者;②年龄 < 18 岁或 > 80 岁,妊娠期或哺乳期妇女,过敏体质及对本药过敏者;③合并严重心、脑、肝、肾疾病及精神病患者。

1.4 治疗方法 FSG 组给予 FSG,方药组成:红参(须)20 g,鹿角(片)10 g,龟甲(炙)10 g,熟地黄 10 g,菟丝子 10 g 等组成,由上海中医药大学附属曙光医院制剂室制备,批号 20141209,12 g/包。1 包/次,3 次/d(*tid*),口服。安特尔组给予安特尔(十一酸睾酮胶丸,南京欧加农制药有限公司,进口药品注册证号 H20140962)。每次 40 mg/次,*tid*,口服。两组均干预 3 个月。同时两组均予以以下支持治疗,①如血红蛋白 < 60 g·L⁻¹,予红细胞悬液输注;②如血小板(PLT) < 5.0 × 10⁹ 个/L(无出血危险因素)或 PLT < 20.0 × 10⁹ 个/L(有明显出血倾向,或存在出血危险因素),予 PLT 悬液输注及对症止血治疗;③如合并感染,及时给予有效抗感染治疗。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 试剂与仪器 Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双染法细胞凋亡检测试剂盒(上海七星生物科技有限公司,批号 A009-01);PE/Cy5 标记鼠抗人 CD34 单克隆抗体(BD 公司,批号 5041868);兔抗 p-p38 多克隆抗体,兔抗 p38 多克隆抗体,兔抗 p-p53 多克隆抗体,兔抗 B 淋巴细胞瘤-2 相关 xl 蛋白(Bcl-xl)单克隆抗体,兔抗 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)单克隆抗体(CST 公司,批号分别为 9211,9212,2676,2764,2872);丝裂原活化蛋白激酶激酶(MKK)3/6 小鼠单克隆抗体(Stan Cruz 公司,批号 sc128930);β-肌动蛋白(β-actin),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)小鼠单克隆抗体(Immunoway 公司,批号分别为 YM3028,TDY042);HRP 标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 抗体(上海博古生物科技有限公司,批号 S004);PCR 逆转录试剂盒(ABI 公司,批号 C0521A)。

Cytomics FC500 型流式细胞仪(美国 Beckman

Coulter 公司);Fresco 型低温冷冻离心机,MultiSkan3 型酶标仪(美国 Thermo 公司);Semi-Dry Transfer Cell 170-3940 型半干转膜仪,PowerPac™ HC 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);ABI7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.5.2 外周血细胞计数 每 2 周用 COULTER LH750 型全自动血细胞分析仪检测 1 次。

1.5.3 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡率 分别获取治疗前后两组患者、正常组 EDTA 抗凝骨髓液 2 mL,裂解红细胞,用 4 °C 预冷磷酸盐缓冲(PBS)洗涤;将 1 × 10⁶ 个细胞加入 PE 标记的 CD34 单抗,避光 4 °C 孵育 45 min;PBS 洗涤,加入 1 × Binding Buffer 200 μL;加入 Annexin V-FITC 5 μL,避光室温孵育 15 min;上机前 5 min 加入 PI 5 μL;每个样本检测 1 × 10⁶ 个细胞。用 CXP 软件分析数据。

1.5.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 获取患者肝素钠抗凝骨髓液 5 mL,淋巴细胞分离液骨髓单个核细胞(BMMNC),提取蛋白样本,BCA 法蛋白定量,以 RIPA 调整蛋白浓度。根据目的蛋白的分子量,配制 12% 的分离胶,浓缩胶浓度为 5%。上样。电泳。300 mA 转膜 1 h。转膜完成后丽春红染色试剂对膜进行染色,观察转膜效果。将膜完全浸没 3% BSA-TBST 中封闭 30 min。加入 p38, p-p38, MKK3/6, p-p53, Bcl-xl, Bcl-2 一抗(1:1 000),稀释山羊抗兔 IgG 抗体(1:2 万),分别进行免疫蛋白印迹分析。ECL 法显色成像,分别以 GAPDH,β-actin 为内参蛋白,用 Quantity one 分析各蛋白条带灰度值。

1.5.5 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 p38MAPK mRNA 表达 所有基因序列从 GenBank 中获取,引物用 Primer5.0 软件进行设计。荧光定量引物均由上海闪晶生物技术有限公司合成,p38 引物(112 bp):上游 5'-GTTGATATTTGGTCA GTGGATG-3',下游 5'-TTCCAACGAGTCTT AAAATGAGC-3';GAPDH(92 bp):上游 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3',下游 5'-AGCCAGGATGCCCTTTAGT-3'。RNA 提取和 cDNA 合成,获取患者肝素钠抗凝骨髓液 2 mL,淋巴细胞分离液 BMMNC,加 Trizol 提取 RNA 后定量。按照逆转录试剂盒方法在 PCR 热循环仪中将其逆转录为 cDNA。所有基因实时荧光定量 PCR 按 20 μL 反应体系进行。样品管和内参管均设 2 个复管。反应条件:95 °C 变性 30 s,95 °C 5 s,60 °C 31 s,

40 个循环。反应结束后,ABI7300 SDS Software 自动分析荧光信号并将其转换 C_t 。p38MAPK mRNA 相对表达量采用 GAPDH 标化,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件,正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料满足正态分布且方差齐性,组间比较采用成组 t 检验,同组治疗前后比较采用配对 t 检验。若资料呈偏态分布,进行相应的变量变换后呈正态分布且方差齐性者采用 t 检验,若变换后仍不服从正态分布或方差仍

不齐,采用非参数的秩和检验。用 Pearson 分析对 p-p38 MAPK 蛋白表达和 CD34⁺ 细胞凋亡率进行相关性分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组患者治疗前后血细胞计数比较 与治疗前比较,FSG 组治疗后红细胞计数、血红蛋白量、血小板均上升($P < 0.05, P < 0.01$),白细胞计数差异无统计学意义;治疗后两组患者白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板计数差异无统计学意义。见表 1。

表 1 2 组 lower-risk MDS 患者治疗前后外周血细胞计数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of peripheral blood cell count before and after treatment in patients with lower-risk MDS($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	白细胞/ $\times 10^9$ 个/L	红细胞/ $\times 10^{12}$ 个/L	血红蛋白/ $g \cdot L^{-1}$	血小板/ $\times 10^9$ 个/L
FSG	治疗前	30	3.43 \pm 2.69	2.53 \pm 0.96	85.90 \pm 30.00	52.03 \pm 59.05
	治疗后	29	3.75 \pm 1.71	2.95 \pm 0.86 ²⁾	98.93 \pm 26.57 ²⁾	60.41 \pm 65.12 ¹⁾
安特尔	治疗前	30	3.72 \pm 2.30	2.46 \pm 0.96	82.14 \pm 27.97	73.92 \pm 89.41
	治疗后	28	3.80 \pm 1.95	2.65 \pm 0.95	88.11 \pm 29.65	75.04 \pm 63.54

注:与本组治疗前比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$ 。

2.2 各组患者骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡率比较 和正常组比较,lower-risk MDS 治疗前骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡率增加($P < 0.01$)。治疗前安特尔组,FSG 组差异无统计学意义。治疗后 FSG 组 CD34⁺ 细胞凋亡率较治疗前降低,但仍高于正常组($P < 0.05$);安特尔组治疗前后 CD34⁺ 细胞凋亡率差异无统计学意义。见表 2。

2.3 各组患者 BMMNC 中 p38, p-p38, MKK3/6, p-p53, Bcl-xl, Bcl-2 蛋白表达比较 与对照组比较,lower-risk MDS 患者治疗前 p-p38, MKK3/6, p-p53 蛋白表达增加,Bcl-xl 蛋白表达降低($P < 0.05$),p38, Bcl-2 蛋白表达差异无统计学意义;p-p38 表达治疗后也高于正常组($P < 0.05$)。治疗前 FSG 组,安特尔组蛋白表达差异无统计学意义。与治疗前比较,FSG 组治疗后 p-p38, MKK3/6, p-p53 表达降低,Bcl-xl 表达增加($P < 0.05$),p38, Bcl-2 蛋白表达差异无统计学意义。安特尔组治疗前后的差异均无统计学意义。见表 3,图 1。

表 2 各组患者骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of apoptosis rates of CD34⁺ cells in bone marrow($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	凋亡率/%
正常	-	7	61.54 \pm 12.12
FSG	治疗前	12	89.50 \pm 5.87 ²⁾
	治疗后	12	75.90 \pm 12.84 ^{1,3)}
安特尔	治疗前	12	89.86 \pm 12.08 ²⁾
	治疗后	12	86.22 \pm 11.32 ²⁾

注:与安特尔组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$;与本组治疗前比较³⁾ $P < 0.05$ 。

2.4 各组患者 BMMNC 中 p38 MAPK mRNA 表达比较 与对照组比较,lower-risk MDS p38 MAPK mRNA 表达差异无统计学意义,两组治疗前后差异亦无统计学意义。见表 4。

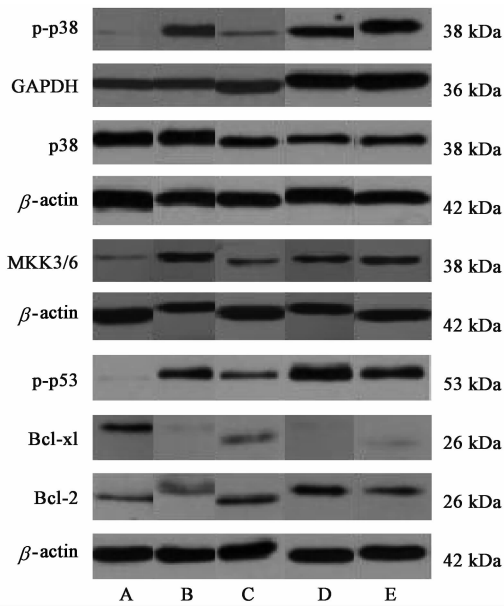
2.5 p-p38 蛋白表达和 CD34⁺ 细胞凋亡率相关性分析 对照组 lower-risk MDS 治疗前骨髓 p-p38

表 3 各组患者 BMMNC 中 p-p38, p38, MKK3/6, p-p53, Bcl-xl, Bcl-2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison of p-p38, p38, MKK3/6, p-p53, Bcl-xl, and Bcl-2 protein expression levels in BMMNC($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	时间	p-p38/GAPDH	p38/ β -actin	MKK3/6/ β -actin	p-p53/ β -actin	Bcl-xl/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
正常	-	0.02 \pm 0.10	0.57 \pm 0.32	0.11 \pm 0.17	0.13 \pm 0.18	0.95 \pm 0.56	0.59 \pm 0.96
FSG	治疗前	0.37 \pm 0.28 ¹⁾	0.49 \pm 0.35	0.68 \pm 0.50 ¹⁾	0.48 \pm 0.21 ¹⁾	0.05 \pm 0.02 ¹⁾	0.37 \pm 0.30
	治疗后	0.07 \pm 0.05 ^{1,2)}	0.65 \pm 0.20	0.17 \pm 0.20 ²⁾	0.25 \pm 0.14 ²⁾	0.59 \pm 0.49 ²⁾	0.29 \pm 0.32
安特尔	治疗前	0.39 \pm 0.29 ¹⁾	0.65 \pm 0.17	0.62 \pm 0.47 ¹⁾	0.51 \pm 0.25 ¹⁾	0.02 \pm 0.01 ¹⁾	0.38 \pm 0.39
	治疗后	0.26 \pm 0.25 ¹⁾	0.73 \pm 0.14	0.28 \pm 0.30	0.43 \pm 0.23	0.42 \pm 0.17	0.33 \pm 0.34

注:与安特尔组比较¹⁾ $P < 0.05$;与本组治疗前比较²⁾ $P < 0.05$ 。



A. 正常组; B, C. FSG 组治疗前后; D, E. 安特尔组治疗前后

图 1 各组患者 BMMNC 中 p38, p-p38, MKK3/6, p-p53, Bcl-x1, Bcl-2 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of p38, p-p38, MKK3/6, p-p53, Bcl-x1 and Bcl-2 protein expression in BMMNC

表 4 各组患者 BMMNC 中 p38 MAPK mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of p38 MAPK mRNA expression levels in BMMNC ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	p38 MAPK
正常	-	7	1.38 ± 1.15
FSG	治疗前	12	1.23 ± 0.98
	治疗后	12	1.45 ± 1.18
安特尔	治疗前	12	1.34 ± 1.24
	治疗后	12	1.30 ± 1.21

蛋白表达和 CD34⁺ 细胞凋亡率成正相关 ($r = 0.723, P = 0.001$)。治疗后, FSG 组骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡率下降与 p-p38 蛋白表达水平下降成正相关 ($r = 0.943, P = 0.005$); 安特尔组治疗后 CD34⁺ 细胞凋亡率下降, 与 p-p38 蛋白表达水平下降的相关系数无统计学意义 ($r = 0.340, P = 0.576$)。

3 讨论

根据 MDS 临床表现, 既往将其归属中医“虚劳”、“血证”等范畴, 2008 年中国中西医结合学会血液病专业委员会与中华中医药学会内科分会血液病专业组将 MDS 命名为“髓毒劳”, 毒为病性, 劳为病状, 髓为病位。对于病机, 大多数学者认为是正虚邪实, 但对 MDS 的标本问题却存在两种截然不同的主张, 有以瘀毒为本, 有以正虚为本^[7]。本课题组认为, 大多 lower-risk MDS 起病缓慢, 病程较长, 临床

主要表现为头晕乏力、形寒肢冷、心悸、唇甲色淡等贫血相关症状, 部分患者仅见乏力、腰酸, 与中医“虚劳”证候更相类似。这类 MDS 的病机特点是毒邪不盛, 以虚为本, 以劳为主, “虚者补之”, “劳者温之”, 故治疗以补脾益肾填精益髓为主。FSG 方中以红参(须)、鹿角(片)为君, 温阳益气以促髓造血, 熟地黄、龟甲为臣, 滋阴补肾, 既可达阳得阴助生化无穷之效, 又可除温阳药物耗伤阴血之弊, 菟丝子、枸杞子为佐, 补肾益精。附子(熟)、肉桂为使, 辛甘大热, 温中补肾, 共奏温肾益髓之效。该方最早用于肾阳虚型再生障碍性贫血的治疗。此后, 本课题组根据“异病同治”中医理论, 将其用于 MDS 肾阳虚证的治疗。前期的研究发现, FSG 联合雄激素治疗 MDS 总有效率为 86.7%, 优于单用雄激素, 其中以 RA 型疗效最好, RAEB 型疗效最差^[4]。本研究亦发现, 经 FSG 干预后, MDS 患者红系造血改善显著。提示该复方对红系无效造血有更好的改善作用。

多数研究认为, 骨髓 CD34⁺ 细胞过度凋亡是 lower-risk MDS 的主要特征^[8-9]。在 MDS 的早期阶段, 由于肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 干扰素- γ (IFN- γ), 转化生长因子- β (TGF- β), 血管内皮生长因子 (VEGF) 等造血抑制因子的异常高表达、骨髓微环境改变及异常的基质免疫调节^[10] 导致骨髓造血细胞, 尤其是 CD34⁺ 细胞发生凋亡。一般认为阻止造血干/祖细胞凋亡会加速 MDS 向 AML 的转变, 但有研究发现, 阻止 lower-risk MDS 骨髓造血干/祖细胞凋亡可恢复造血干/祖细胞静止, 减少应激相关的 DNA 损伤修复和基因组不稳定性, 而后者是细胞获得额外遗传突变而导致疾病进展的重要机制^[11]。本研究发现, lower-risk MDS 患者骨髓 CD34⁺ 细胞存在高凋亡率, 和非 MDS 患者比较, 差异有统计学意义。经 FSG 治疗后, CD34⁺ 细胞凋亡率下降, 但和非 MDS 患者比较, 仍然显著增加。

p38 MAPK 是 MAPK 家族中的重要组成部分, p38 MAPK 通过非磷酸化转化为磷酸化状态, 促进下游底物的磷酸化来实现信号传递, 在细胞凋亡、分化、周期调控等过程中起重要作用。lower-risk MDS 骨髓造血细胞存在 p38 组成性激活, 导致细胞内 p-p38 表达增加^[12]。TNF- α , IFN- γ , TGF- β , VEGF 等造血抑制因子均可通过共同的 p38 MAPK 信号通路诱导骨髓 CD34⁺ 细胞的过度凋亡, 从而导致骨髓无效造血。阻断该通路可减少造血细胞凋亡, 改善骨髓无效造血。p38 抑制剂可能成为 lower-risk MDS 的有效治疗手段^[13]。本研究发现, 和非 MDS 患者

比较, lower-risk MDS 患者骨髓造血细胞存在 p-p38 的高表达, 两者差异有统计学意义, p38 蛋白及 mRNA 表达的差异无统计学意义。提示在 lower-risk MDS 患者骨髓细胞中, 存在 p38 MAPK 通路的过度激活, 而非 p38 蛋白表达和转录的增加。经 FSG 治疗后, p-p38 表达虽然下降, 但和非 MDS 患者比较仍然增加。结合相关性分析, 本研究发现 lower-risk MDS 骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡率和 p-p38 蛋白表达存在正相关。FSG 治疗后, CD34⁺ 细胞凋亡率下降与 p-p38 蛋白表达水平下降呈正相关, 提示 FSG 至少能通过调控 p38 MAPK 通路抑制 CD34⁺ 细胞凋亡, 从而改善骨髓无效造血。

已知 MKK3/6 是 p38 MAPK 信号通路上游主要激活因子, 激活后的 MKK3/6 使 p38 MAPK 磷酸化, 从而活化 p38 MAPK 通路。而 p53 和 Bcl-2 家族蛋白是异常激活的 p38 MAPK 通路下游重要的凋亡调控分子^[14]。lower-risk MDS 骨髓细胞中存在 p38 MAPK 通路相关蛋白如 MKK3/6, p-p38, p-p53 表达活性的异常增高, FSG 干预后则降低。Bcl-2, Bcl-xl 是 Bcl-2 家族蛋白主要抗凋亡蛋白, 在骨髓 CD34⁺ 细胞上均有表达。Bcl-2, Bcl-xl 均能与促凋亡蛋白如 Bax, Bak 形成异二聚体, 中和促凋亡作用。和对照组比较, lower-risk MDS 患者骨髓细胞中, Bcl-xl 的表达显著降低, Bcl-2 的表达则无显著差异, 提示过度激活的 p38 MAPK 可能主要促进 Bcl-xl 降解, 导致促凋亡蛋白从与 Bcl-xl 的复合体中释放出来, 激活并寡聚化, 启动凋亡。安特尔组治疗前后的改变无统计学意义, 可能与安特尔主要通过刺激促红细胞生成素(EPO)的产生, 加强造血细胞对 EPO 的反应来改善红系造血的作用机制有关。而 MDS 患者不同的 EPO 水平决定了不同的治疗反应。本研究中, 由于研究目的、病例数限制, 并未根据患者 EPO 水平进行分层研究。

综上所述, lower-risk MDS 患者骨髓 CD34⁺ 细胞的高凋亡与 p38 MAPK 信号通路的异常活化有关。FSG 能有效改善 MDS 患者骨髓的无效造血, 其机制与抑制 p38 MAPK 磷酸化, 减少骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡有关。FSG 似乎对红系无效造血有更好的改善作用, 是否与活化的 p38 MAPK 参与骨髓造血调控的特定底物有关, 有待进一步的研究证实。

[参考文献]

[1] MA X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes[J].

Am J Med, 2012, 125(Suppl7):2-5.

[2] Fenaux P, Ades L. How we treat lower-risk myelodysplastic syndromes[J]. Blood, 2013, 121(21): 4280-4286.

[3] Bachegowda L, Gligich O, Mantzaris I, et al. Signal transduction inhibitors in treatment of myelodysplastic syndromes[J]. J Hematol Oncol, 2013, 6(1):50-53.

[4] 赵琳, 邱仲川, 江秀花, 等. 复方补肾冲剂治疗肾阳虚型骨髓增生异常综合征的研究[J]. 上海医学, 2006, 29(3):147-149.

[5] 中华医学会血液学分会. 骨髓增生异常综合征诊断与治疗专家共识[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(4): 347-352.

[6] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1995:178.

[7] 张翔, 叶宝东, 周郁鸿. 骨髓增生异常综合征中西医结合诊治概述[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(5): 717-720.

[8] Aggarwal S, van de Loosdrecht A A, Alhan C, et al. Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk MDS and highrisk MDS; implications for immunotherapy[J]. Br J Haematol, 2011, 153(5):568-581.

[9] Greenberg P L. Molecular and genetic features of myelodysplastic syndromes[J]. Int J Lab Hematol, 2012, 34(3):215-222.

[10] Ishibashi M, Tamura H, Ogata K. Disease progression mechanism in myelodysplastic syndromes; insight into the role of the microenvironment[J]. Leuk Res, 2011, 35(11):1449-1452.

[11] Slape C I, Saw J, Jowett J B, et al. Inhibition of apoptosis by Bcl2 prevents leukemic transformation of a murine myelodysplastic syndrome[J]. Blood, 2012, 120(12): 2475-2483.

[12] Bachegowda L, Gligich O, Mantzaris I, et al. Signal transduction inhibitors in treatment of myelodysplastic syndromes[J]. J Hematol Oncol, 2013, 6(1):50-51.

[13] Sokol L, Cripe L, Kantarjian H, et al. Randomized, dose-escalation study of the p38 α MAPK inhibitor SCIO-469 in patients with myelodysplastic syndrome[J]. Leukemia, 2013, 27(4):977-980.

[14] PENG H M, WEN J G, ZHANG L X, et al. A systematic modeling study on the pathogenic role of p38 MAPK activation in myelodysplastic syndrome[J]. Mol Biosyst, 2012, 8(4):1366-1374.

[责任编辑 张丰丰]