

· 临床 ·

扶正、祛邪中药复方对骨髓增生异常综合征 骨髓细胞红系转录因子水平调控的表观遗传学机制

许鸣^{1,2}, 郭元成³, 任建业³, 徐白雪⁴, 曾庆², 胡琦³, 陆嘉惠^{3*}

(1. 桐乡市第一人民医院, 浙江 桐乡 314500;

2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437;

3. 上海中医药大学附属市中医医院, 上海 200071; 4. 华东理工大学药学院, 上海 200237)

[摘要] 目的:检测骨髓增生异常综合征(MDS)患者骨髓单个核细胞(BMMNCs)红系转录因子(GATA-1),组蛋白去乙酰化酶(HDAC1)的表达水平,分析经HDAC抑制剂(HDACI)伏立诺他(SAHA)、扶正、祛邪中药复方对不同证型MDS患者BMMNCs干预后的HDAC1,GATA-1表达变化,探讨MDS红系转录与表观遗传学组蛋白去乙酰化的可能关联性,以及扶正、祛邪中药对其干预的作用机制。方法:收集确诊MDS患者正虚组10例,瘀毒组5例以及正常组3例BMMNCs进行体外培养。采用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测扶正、祛邪药物及SAHA干预前后HDAC1和GATA-1 mRNA和蛋白水平。结果:MDS患者GATA-1 mRNA和蛋白水平均低于正常人($P < 0.05$),HDAC1 mRNA和蛋白水平均高于正常人($P < 0.05$),正虚型患者与瘀毒型患者间未发现明显差异;经HDACI(SAHA)干预后HDAC1水平下降,同时GATA-1水平显著上升($P < 0.01$),扶正、祛邪中药能上调各组GATA-1表达水平,下调HDAC1表达水平($P < 0.01$)。结论:表观遗传学组蛋白乙酰化与红系转录水平异常与MDS发病有关,扶正、祛邪中药对正虚、瘀毒型MDS患者BMMNCs的组蛋白乙酰化和GATA-1表达水平均具有调控作用。在MDS患者的BMMNCs中,HDAC1与GATA-1表达呈负相关趋势,可能存在经HDAC调控红系转录的信号通路,中药具有HDACI类似的干预作用,但扶正、祛邪中药间尚未发现明显差异。

[关键词] 骨髓增生异常综合征; 中药醇提物; 骨髓单个核细胞; 表观遗传学; 红系转录

[中图分类号] R22; R24; R551.3; R259; R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0199-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180618

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1830.033.html>

[网络出版时间] 2017-12-27 13:50

Effect of Compound Chinese Medicine Formulas of Strengthening Healthy Energy and Eliminating Pathogenic Factors on GATA-1 Activation via Histone Acetylation Modulation in Bone Marrow Mono-nuclear Cells from Myelodysplastic Syndromes Patients *in Vitro*

XU Ming^{1,2}, GUO Yuan-cheng³, REN Jian-ye³, XU Bai-xue⁴, ZENG Qing², HU Qi³, LU Jia-hui^{3*}

(1. The First People's Hospital of Tongxiang, Tongxiang 314500, China;

2. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 200437, China;

3. Shanghai Municipal Hospital of TCM, Shanghai University of TCM, Shanghai 200071, China;

4. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression levels of globin transcription factor-1 (GATA-1) and histone deacetylase-1 (HDAC-1) of bone marrow mono-nuclear cells (BMMNCs) in patients of myelodysplastic

[收稿日期] 20170803(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573928)

[第一作者] 许鸣, 硕士, 主治医师, 从事中医药治疗血液系统恶性肿瘤临床和实验研究, Tel:0573-88218073, E-mail:minghsu@163.com

[通信作者] *陆嘉惠, 博士, 主任医师, 教授, 从事中西医结合血液病临床和机制研究, Tel:021-56639828, E-mail:lujiahui73@163.com

syndrome (MDS), in order to analyze the effects of Chinces medicine formulas of ‘strengthening healthy energy’ and ‘eliminating pathogenic factors’ and HDAC inhibitor Vorinostat (SAHA) on acetylation and GATA-1 activation of bone marrow mono-nuclear cells (BMMNCs) from MDS patients *in vitro*. **Method:** BMMNCs were collected from 10 lower-risk MDS patients, 5 higher-risk MDS patients and 3 healthy control cases, and then treated with ethanol-extracts of compound Chinese medicine formulas of ‘strengthening healthy energy’ or ‘eliminating pathogenic factors’, or SAHA as positive control for 48 h. The mRNA and protein expression levels of histone deacetylase 1 (HDAC1) and erythroid transcription factor (GATA-1) were detected by Real-time PCR and Western blot. **Result:** After treatment with the formula of ‘strengthening healthy energy’ or ‘eliminating pathogenic factors’ at the concentrations from 0.062 5 to 2.0 g · L⁻¹ for 48 hours, or with SAHA at the concentraions from 3.125 to 10 μmol · L⁻¹ for 48 hours, mRNA and its protein expression levels of HDAC1, GATA-1 were significant different compared with normal group. The formula of ‘strengthening healthy energy’ or ‘eliminating pathogenic factors’ could increase GATA-1 expression by regulating histone acetylation in both lower-risk and higher-risk MDS patients ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The data suggests that epigenetic alternation may be one of the important therapeutic mechanisms of SAHA and ethanol-extracts of compound Chinese medicine on erythroid transcription regulation. In our study, Chinese medicine formulas had a HDAC1-like acetylation regulating effect, but with no significant difference between the formulas of ‘strengthening healthy energy’ formula and ‘eliminating pathogenic factors’.

[**Key words**] myelodysplastic syndrome; ethanol-extracts of compound Chinese medicine; bone marrow mono-nuclear cell; epigenetics; erythroid transcription

骨髓增生异常综合征(MDS)是一组起源于造血干细胞的血液系统恶性克隆增殖性疾病^[1],表现为无效造血、难治性血细胞减少以及造血功能衰竭。难治性贫血是对MDS临床特征的最初认识,近年对其发病机制中的骨髓微环境红系转录因子(GATA-1)表达失调,以及表观遗传学改变开展了大量研究^[2]。近期,诸多研究报告显示GATA1的表达与表观遗传调控有一定相关性,GATA-1与组蛋白去乙酰化酶(HDAC1)共同参与了红系分化成熟过程,组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACI)可通过抑制HDAC1水平诱导GATA-1的表达,从而发挥在红细胞成熟中的调控作用^[3]。

促红细胞生成素(EPO),免疫调节剂,表观遗传学作用药物等是当前美国国立综合癌症网络(NCCN)指南推荐的主要MDS治疗药物^[4],中医药辨证论治因其更符合MDS分层治疗原则,故被中国血液临床医师所接受,目前大量临床研究也已证明中西医结合治疗MDS具有良好的临床疗效^[5-7]。中医对MDS的认识比较统一,认为“正虚邪实”是MDS的基本病机,“虚实转化”是MDS疾病进程中的基本证候特点,“健脾补肾以扶正,活血解毒以祛邪”是MDS的基本治法。本课题组前期运用扶正、祛邪法,以健脾补肾活血解毒方药治疗各个危度MDS患者,总有效率为64.77%,且安全性高,无明

显毒副作用^[8];同时对“正虚”、“瘀毒”不同证型MDS核转录因子-κB(NF-κB)及细胞凋亡水平分析,证明两者存在差异性,并与MDS危度分层呈相关性^[9]。课题组对“健脾补肾活血解毒”有效方药进行进一步精简,以便于开展更为深入的机制研究,前期已回顾性分析了140例健脾补肾活血解毒法治疗有效的MDS患者,研究发现扶正、祛邪中药对“正虚”、“瘀毒”不同证型MDS患者中医证候、生存质量改善的同时,对改善贫血相关症状及外周血红系减少具有更为显著的疗效,此结论为开展中医药对MDS红系转录及其相关作用途径、机制的研究奠定了临床基础。

因此,基于组蛋白去乙酰化在MDS发病机制中的重要地位及其靶向药物临床疗效的证实,GATA-1在MDS难治性贫血中促进红系分化的作用,组蛋白去乙酰化与GATA-1共同参与MDS红系调控作用,扶正、祛邪中药对MDS干预的潜在靶点作用等方面的认识,本研究对10例相对低危组(低危、中危-1)MDS患者,5例相对高危组(中危-2,高危)MDS患者骨髓样本进行中药醇提物体外干预实验,从影响MDS红系转录的组蛋白乙酰化表观遗传学机制角度,探讨GATA-1和HDAC1表达异常在MDS发病中的相关性,并通过扶正、祛邪方药干预MDS患者组蛋白去乙酰化及红系转录的作用研究,进一步

阐明中药的作用机制,为扶正、祛邪复方联合表观遗传学靶向药物治疗 MDS 以期获得“增效减毒”作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集符合 2006 年版维也纳诊断标准^[10] MDS 患者骨髓标本 15 份,依据 WHO 2008 年 MDS 分型标准及国际预后积分系统 (IPSS) 危度划分标准^[11] 进行西医分型。其中正虚组(按 IPSS 评分为低危/中危-1 组)包括脾肾阳虚和脾肾阴虚共 10 例,瘀毒组(按 IPSS 评分为中危-2/高危组)5 例,均取髂前上棘骨髓样本。对照组 3 例取自胸外科手术切除的肋骨骨髓样本,无肿瘤细胞的骨髓转移、未接受放疗或化疗、造血系统正常。正虚组患者男性 7 例,女性 3 例,最小年龄 33 岁,最大年龄 79 岁,年龄(64 ± 13.5)岁;瘀毒组患者男性 4 例,女性 1 例,最小年龄 43 岁,最大年龄 71 岁,年龄(56 ± 11.8)岁;正常组男性 1 例,女性 2 例,最小年龄 51 岁,最大年龄 63 岁,年龄(56 ± 6.2)岁,正虚组、瘀毒组和

正常组病例的年龄、性别比较无显著性差异。所有 MDS 患者和对照组患者均签署知情同意书,本研究经过上海中医药大学附属市中医医院伦理委员会批准(批号 2015SHL-KY-23)。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 采用维也纳诊断标准^[10],必要条件:①持续(≥6 个月)一系或多系血细胞减少,血红蛋白(HGB < 110 g·L⁻¹),中性粒细胞[中性粒细胞绝对计数(ANC) < 1.5 × 10⁹ 个/L],血小板(PLT < 100 × 10⁹ 个/L);②排除其他可以导致血细胞减少和病态造血的造血及非造血系统疾患。确定标准:①骨髓涂片中红细胞系、中性粒细胞系、巨核细胞系中任一系至少 10% 有发育异常;②环状铁粒幼红细胞占有核红细胞比例 ≥ 15%;③原始细胞,骨髓涂片中达 5% ~ 19%;④染色体异常。必须满足 2 个必要条件和 1 个确定标准。

1.2.2 分型标准 分型依据 WHO 2008 年 MDS 分型标准^[11] 严格执行,见表 1。

表 1 WHO 2008 MDS 分型^[11]

Table 1 2008 WHO Classification of MDS^[11]

亚型	外周血	骨髓
难治性贫血伴单系异常(RCUD)	单系或双系血细胞减少	1 个细胞系中 ≥ 10% 的细胞发育不良,原始细胞 < 5%
难治性贫血伴有环状铁粒幼细胞(RARS)	贫血,无原始细胞	环状铁粒幼细胞/红系前体细胞 ≥ 15%,仅有红系发育不良,原始细胞 < 5%
难治性血细胞减少伴有多系发育异常(RCMD)	血细胞减少(两系或全血细胞减少),单核细胞 < 1 × 10 ⁹ 个/L	髓系中 ≥ 2 个系别发育异常的细胞 ≥ 10%,环状铁粒幼细胞 < 15%,原始细胞 < 5%
难治性贫血伴有原始细胞过多-1(RAEB-1)	血细胞减少,原始细胞 ≤ 2% ~ 4%,单核细胞 < 1 × 10 ⁹ 个/L	单系或多系发育异常,原始细胞 5% ~ 9%,无 Auer 小体
难治性贫血伴有原始细胞过多-2(RAEB-2)	血细胞减少,原始细胞 5% ~ 19%,单核细胞 < 1 × 10 ⁹ 个/L	单系或多系发育异常,原始细胞 10% ~ 19%,Auer 小体(±)
MDS,不能分类(MDS-U)	血细胞减少,原始细胞 ± 1%	单系发育不良或发育正常,但是符合 MDS 的细胞遗传学特征,原始细胞 < 5%
MDS 伴有单纯 del(5q)	贫血,血小板数正常或增高	红系单系发育不良,原始细胞 < 5%,单纯 del(5q)

1.2.3 危度划分 依据 WHO 2012 年版国际预后积分系统 (IPSS)^[11] 严格执行,见表 2。

表 2 IPSS 积分标准^[11]

Table 2 International prognostic scoring system^[11] 分

参数	0	0.5	1.0	1.5	2.0
骨髓原始细胞数(%)	< 5	5 ~ 10	-	11 ~ 20	21 ~ 30
染色体核型*	良好	中间	不良	-	-
外周血细胞减少数	0 ~ 1 系	2 ~ 3 系	-	-	-

注:*. 预后良好核型,正常核型,-Y,5q-,20q-;预后不良核型,复杂核型异常(≥3 种异常),7 号染色体异常;预后中间核型,除上述两类外其他核型异常。

1.2.4 中医诊断标准 参照《实用中医血液病学》^[12] 中相关证候诊断标准,并结合前期临床研究作必要合并,中医辨证为脾肾两虚证(正虚为主兼有瘀毒型),瘀毒内蕴证(瘀毒为主兼有脾肾亏虚型),其中脾肾两虚证包括脾肾阳虚和脾肾阴虚两型。

脾肾两虚证,主证,面色萎黄,语言低微,倦怠,心悸气短;肌肤衄血发斑。脾肾阳虚型,主证,畏寒肢冷、关节疼痛、脘腹冷痛。脾肾阴虚型,主证,咽干口渴,午后潮热、肌肤干燥、五心烦热。次证,头晕眩晕,食少,耳鸣腰酸,自汗盗汗,失眠,下利清谷,小

便清长,男子遗精,女子月经量少,舌胖、边有齿痕,或舌红少苔、无苔,脉沉细。

瘀毒内蕴证,主证,面色晦滞,消瘦乏力;衄血发斑、尿血便血;发热,口糜咽痛;骨痛。次证,头痛头晕,胸闷心悸,耳鸣腰酸,热不为汗解,便秘溲黄,痛经,月经量少有血块,舌紫黯有瘀斑,苔厚腻,脉沉细涩或虚大弦滑。

1.3 纳入标准 年龄 18~75 岁;符合 MDS 西医诊断标准;符合中医证候诊断标准,经 2 名具有高级职称的中医血液病专家辨证确定。

1.4 排除标准 继发性 MDS;合并其他血液或非血液系统肿瘤患者;合并有较严重的心肝肾等器质性病变者;妊娠期或哺乳期患者;精神疾病患者。

1.5 药物制备

1.5.1 扶正组方 太子参、菟丝子、女贞子(按体积 1:1:1 配制)。太子参对照药材(北京中科质检生物技术有限公司,批号 121004)粉末 1 g,加甲醇 10 mL,温浸,振摇 30 min,滤过,滤液浓缩至 1 mL,作为供试品溶液^[14]。菟丝子对照药材(北京中科质检生物技术有限公司,批号 121232)粉末 0.5 g,加甲醇 40 mL,加热回流 30 min,滤过,滤液浓缩至 5 mL,作为供试品溶液^[14]。女贞子对照药材(北京中科质检生物技术有限公司,批号 121041)粉末 0.5 g,加三氯甲烷 20 mL,超声处理 30 min,滤过,蒸干,加甲醇 1 mL 使残渣溶解,作为供试品溶液^[14]。

1.5.2 祛邪组方 牡丹皮、白花蛇舌草、三七(按 1:1:1 配制),牡丹皮对照药材(北京中科质检生物技术有限公司,批号 121490)粉末 1 g,加乙醚 10 mL,密塞,振摇 10 min,滤过,滤液挥干,加丙酮 2 mL 使残渣溶解,作为供试品^[14]。白花蛇舌草对照药材(北京中科质检生物技术有限公司,批号 121183)粉末 2 g,应用 85% 乙醇进行回流提取 2 次,过滤,回收乙醇,将过滤液浓缩干燥得白花蛇舌草粉末提取物。将提取物溶于 40% 二甲基亚砜(DMSO)中,制备成 0.4 g·mL⁻¹ 的溶液,备用^[15]。三七对照药材(北京中科质检生物技术有限公司,批号 120941)粉末 0.5 g,加水 5 滴,搅匀,再加以水饱和的正丁醇 5 mL,密塞,振摇 10 min,放置 2 h,离心,取上清液,加 3 倍量以正丁醇饱和的水,摇匀,放置使分层,取正丁醇层,蒸干,加甲醇 1 mL 使残渣溶解,作为供试品溶液^[14]。

1.6 细胞培养 无菌取肝素抗凝的 MDS 患者和正常人骨髓液 5 mL, Ficoll-Hypaque 液常规分离单个核细胞^[13],调整细胞密度为 2 × 10⁶ 个/mL,正常人

样本不加药, MDS 患者样本分为正虚组和瘀毒组;其中 MDS 正虚组和瘀毒组又分为空白组,伏立诺他(SAHA)组,扶正组方组,祛邪组方组;空白组不加入药物, SAHA 组加入 SAHA (正虚组 2.24 μmol·L⁻¹,瘀毒组 2.40 μmol·L⁻¹),扶正组加入太子参、菟丝子、女贞子醇提物(正虚组 1.04 g·L⁻¹,瘀毒组 1.12 g·L⁻¹);祛邪组加入牡丹皮、白花蛇舌草、三七醇提物(正虚组 1.00 g·L⁻¹,瘀毒组 1.09 g·L⁻¹),于 37 °C 5% CO₂ 条件下,用含 10% 小牛血清 + 青霉素 + 链霉素的 RPMI 1640 培养液,置 CO₂ 培养箱培养 48 h 后,进行后续实验。

1.7 试剂及仪器 SAHA (MedChem Express 公司,批号 HY-10221); RPMI 1640 培养基 (HyClone 公司,批号 SH30011), 噻唑蓝 (MTT, Sigma-Aldrich 公司,批号 M5655), RNA 分离试剂 (Thermo Fisher Scientific 公司,批号 15596018), EasyScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒, TransStart[®] Top Green qPCR SuperMix (+ Dye I/ + Dye II) (北京全式金生物技术有限公司,批号分别为 AE311, AQ132), RIPA 裂解液(弱) (碧云天生物科技有限公司,批号 P0013D), GATA-1, HDAC1 单克隆抗体 (Proteintech 公司,批号分别为 60011-1-Ig, 66085-1-Ig), β-肌动蛋白 (β-actin) antibody (Abway 公司,批号 orb10033), peroxidase-conjugated affinipure goat anti-mouse IgG (H + L), peroxidase-conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG (H + L) (Jackson 公司,批号分别为 115-035-003, 111-005-003); 引物由北京六合华大基因有限公司合成, GATA-1 (220 bp): 上游 5'-CACTGACCATGCG GAAGGAT-3', 下游 5'-CCCCGTTTCTTTTCCCTTT-3'; HDAC1 (231 bp): 上游 5'-CCTGACAAGCGCA TCTCGAT-3', 下游 5'-TTTGACTCTCTTGCTTT TTTGAA-3'; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 166 bp): 上游 5'-GGTCGGAGTCAACGGATTTG-3', 下游 5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'。

FACS Verse 型流式细胞仪 (美国 BD 公司), CFX96 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), SW-CJ-IFD 型超净工作台 (上海博讯实业有限公司), Forma 3110 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), XSP-17C 型倒置生物显微镜 (上海长方光学仪器有限公司), ELITE 300 PLUS 型电泳仪 (美国 Wealtec 公司), DYCZ-24DN 型电泳槽和 DYCZ-40D 型转膜槽 (北京六一生物科技有限公司), Tanon5200S 型化学发光成像系统 (上海天能

科技有限公司)。

1.8 方法

1.8.1 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测细胞 HDAC1, GATA-1 mRNA 表达 细胞总 RNA 提取后, 反转录获得 cDNA, 反应体系为 total RNA 1 μg , Oligo(dT)₂₀ primer (0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , 2 \times ES reaction mix 10 μL , EasyScript[®] II RT/RI enzyme mix 1 μL , gDNA remover, 补加 RNase-free water 至总体积为 20 μL 。反应程序为 45 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。以 Premier 5.0 设计引物将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增, 在 20 μL 反应体积中进行。反应体系为 cDNA 模板 1 μg , forward primer (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , reverse primer (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 2 \times TransStart[®] top green qPCR supermix (+ Dye I/ + Dye II) 10 μL , 补加 ddH₂O 至总体积为 20 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s (45 个循环)。采用 ABI Prism 7500 SDS 软件, 分别以 HDAC1, GATA-1, 与 GAPDH 绝对拷贝数之比作为 HDAC1, GATA-1 mRNA 的相对表达量。取 3 次实验的平均值, mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.8.2 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞 HDAC1, GATA-1 蛋白表达 蛋白裂解液提取蛋白, 用 Bradford 法对提取的蛋白样品进行定量, 根据 592 nm 处的吸光度绘制标准曲线, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 加一抗 (1:1 000) 二抗 (1:1 000), 洗膜显影, 将显色后的滤膜进行扫描, 用凝胶图像处理系统分析目的条带灰度值。

1.9 统计学方法 以 SPSS 21.0 软件包对数据进行统计分析, 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间样本均数比较采用 *t* 检验, 多组间样本均数比较采用方差分析, 若不符合方差齐性采用秩和检验, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MDS 患者 BMMNCs 中 HDAC1, GATA-1 mRNA 及蛋白表达水平与正常人 BMMNCs 比较

2.1.1 HDAC1, GATA-1 mRNA 表达 正虚组、瘀毒组 HDAC1 mRNA 表达水平均高于正常组 ($P < 0.05$), 正虚组、瘀毒组 GATA-1 mRNA 表达水平均低于正常组 ($P < 0.05$)。正虚组、瘀毒组组间比较 HDAC1, GATA-1 mRNA 表达水平未见明显差异。见表 3。

2.1.2 HDAC1, GATA-1 蛋白表达 正虚组、瘀毒组 HDAC1 的蛋白表达水平均高于正常组 ($P < 0.05$), 正常组 GATA-1 蛋白表达水平高于正虚组、

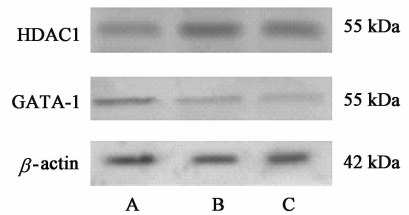
表 3 MDS 正虚组、瘀毒组与正常组 BMMNCs 中 HDAC1, GATA-1 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 HDAC1 and GATA-1 mRNA expression levels of BMMNCs in lower and higher-risk MDS groups and healthy control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HDAC1	GATA-1
正常	3	1.00 \pm 0.90	1.00 \pm 0.10
MDS 正虚	10	5.43 \pm 0.70 ¹⁾	0.14 \pm 0.15 ¹⁾
MDS 瘀毒	5	4.98 \pm 0.40 ¹⁾	0.16 \pm 0.13 ¹⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。

瘀毒组 ($P < 0.05$)。正虚组、瘀毒组组间比较 GATA-1, HDAC1 蛋白表达水平未见明显差异。见图 1, 表 4。



A. 正常组; B. MDS 正虚组; C. MDS 瘀毒组

图 1 MDS 正虚组、瘀毒组与正常组 BMMNCs 中 HDAC1, GATA-1 蛋白表达电泳

Fig. 1 HDAC1 and GATA-1 protein expressions in BMMNCs in lower and higher-risk MDS groups and healthy control group

表 4 MDS 正虚组、瘀毒组与正常组 BMMNCs 中 HDAC1, GATA-1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 HDAC1 and GATA-1 protein expression levels of BMMNCs in lower and higher-risk MDS groups and healthy control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HDAC1/ β -actin	GATA-1/ β -actin
正常	3	1.00 \pm 0.20	1.00 \pm 0.14
MDS 正虚	10	4.64 \pm 0.40 ¹⁾	0.40 \pm 0.08 ¹⁾
MDS 瘀毒	5	3.96 \pm 0.17 ¹⁾	0.32 \pm 0.10 ¹⁾

2.2 SAHA 及扶正、祛邪药物对不同证型 MDS 患者 BMMNCs 中 HDAC1, GATA-1 mRNA 和蛋白表达水平的影响

2.2.1 正虚组 MDS 患者 HDAC1, GATA-1 mRNA 表达 与空白组比较, 扶正组、祛邪组和 SAHA 组 HDAC1 mRNA 水平明显下降 ($P < 0.05$); SAHA 组 GATA-1 mRNA 水平显著上升 ($P < 0.01$), 扶正组、祛邪组 GATA-1 mRNA 水平明显上升 ($P < 0.05$)。扶正组与祛邪组 HDAC1 mRNA 水平在正虚组中无统计学差异。见表 5。

2.2.2 正虚组 MDS 患者 BMMNCs HDAC1, GATA-1 蛋白表达 与空白组比较, 祛邪组和 SAHA

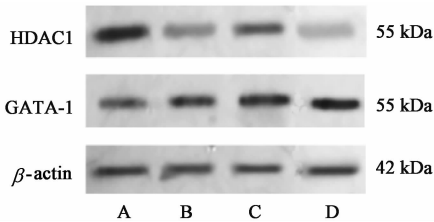
表 5 扶正、祛邪药物干预正虚组 MDS 后 BMMNCs 中 HDAC1, GATA-1 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 HDAC1 and GATA-1 mRNA expression levels of BMMNCs in lower-risk MDS group after treatment($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HDAC1	GATA-1
空白	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.15
SAHA	0.28 ± 0.05 ¹⁾	4.64 ± 0.55 ²⁾
扶正	0.57 ± 0.12 ¹⁾	2.28 ± 0.11 ¹⁾
祛邪	0.44 ± 0.13 ¹⁾	1.37 ± 0.12 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 6~8 同)。

组 HDAC1 蛋白表达明显下调($P < 0.05$), SAHA 组和扶正组与空白组 GATA-1 蛋白表达明显上调($P < 0.05$)。扶正药与祛邪药 HDAC1, GATA-1 蛋白水平比较无统计学差异。见图 2, 表 6。



A. 空白组; B. 扶正组; C. 祛邪组; D. SAHA 组(图 3 同)

图 2 扶正、祛邪干预正虚组 MDS 后 BMMNCs 中的 HDAC1, GATA-1 蛋白表达电泳

Fig. 2 HDAC1 and GATA-1 protein expressions of BMMNCs in lower-risk MDS group after treatment

表 6 扶正、祛邪干预正虚组 MDS 后 BMMNCs 中 HDAC1, GATA-1 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 HDAC1 and GATA-1 protein expressions levels of BMMNCs in lower-risk MDS group after treatment($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HDAC1/ β -actin	GATA-1/ β -actin
空白	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08
SAHA	0.21 ± 0.05 ¹⁾	3.74 ± 0.25 ²⁾
扶正	0.60 ± 0.12	2.08 ± 0.11 ¹⁾
祛邪	0.34 ± 0.10 ¹⁾	1.77 ± 0.12

2.2.3 瘀毒 MDS 患者 BMMNCs 中 HDAC1, GATA-1 mRNA 表达 与空白组比较, SAHA 组 GATA-1 mRNA 水平显著上升, HDAC1 mRNA 水平显著下降($P < 0.01$); 扶正组、祛邪组 GATA-1 mRNA 水平明显上升, HDAC1 mRNA 水平明显下降($P < 0.05$)。见表 7。

2.2.4 瘀毒组 MDS 患者 BMMNCs 中 HDAC1, GATA-1 蛋白表达 与空白组比较, SAHA 组和祛邪组 GATA-1 蛋白水平明显上升($P < 0.05$), HDAC1 蛋白水平明显下降($P < 0.05$)。见图 3, 表 8。

表 7 扶正、祛邪干预瘀毒组 MDS 后 BMMNCs 中的 HDAC1, GATA-1 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 HDAC1 and GATA-1 mRNA expression levels of BMMNCs in higher-risk MDS group after treatment($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HDAC1	GATA-1
空白	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.13
SAHA	0.15 ± 0.07 ¹⁾	6.36 ± 0.77 ²⁾
扶正	0.44 ± 0.08 ¹⁾	1.09 ± 0.08 ¹⁾
祛邪	0.20 ± 0.06 ¹⁾	2.11 ± 0.12 ¹⁾

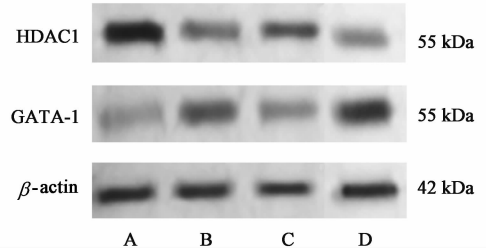


图 3 扶正、祛邪干预瘀毒组 MDS 后 BMMNCs 中 HDAC1, GATA-1 蛋白表达电泳

Fig. 3 HDAC1 and GATA-1 protein expression levels of BMMNCs in higher-risk MDS group after treatment

表 8 扶正、祛邪干预瘀毒组 MDS 后 BMMNCs 中的 HDAC1, GATA-1 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 HDAC1 and GATA-1 protein expression levels of BMMNCs in higher-risk MDS group after treatment($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HDAC1/ β -actin	GATA-1/ β -actin
空白	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.10
SAHA	0.15 ± 0.07 ¹⁾	3.46 ± 0.37 ¹⁾
扶正	0.47 ± 0.08	1.19 ± 0.08
祛邪	0.40 ± 0.06 ¹⁾	2.21 ± 0.12 ¹⁾

3 讨论

MDS 为骨髓造血功能异常导致粒、红、巨三系细胞病态发育, 同时骨髓增生异常活跃且伴显著无效造血的一种造血干细胞疾病, 临床常表现为一系列或多系外周血细胞减少^[16]。MDS 发病机制复杂, 表观遗传学改变如 ASXL1, EZH2 等染色质修饰相关基因突变情况下引起的组蛋白修饰与 MDS 的不良预后密切相关^[17]。在 MDS 细胞株中, 西达本胺可通过降低 HDAC1 的水平阻滞 G_0/G_1 周期抑制 MDS 细胞增殖^[18]。在本研究中, 正虚型(低危, 中危-1)及瘀毒型(中危-2, 高危) MDS 患者 BMMNCs 中的 HDAC1 水平均较正常组明显升高, 通过中药干预可显著降低 HDAC1 水平。另外, 造血系统转录因子 GATA-1 与 MDS 难治性贫血的临床表现有关, 在正常红系早期发育过程中 GATA-1 可以通

过诱导抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的表达抑制原红细胞凋亡。有研究显示骨髓中 GATA-1 低表达的 MDS 患者较正常表达 GATA-1 的 MDS 患者贫血程度更为严重,提示 GATA-1 的下调与 MDS 红系分化异常有关^[19]。在本研究中,正虚型(低危,中危-1)及瘀毒型(中危-2,高危)MDS 患者 BMMNCs 中的 GATA-1 水平均较正常组明显下降,且通过中药干预可显著升高 GATA-1 水平。

诸多研究显示 GATA1 的表达与表观遗传的调控有关,随着红细胞的成熟,HDAC1 的数量和活化程度均显著升高,同时 GATA-1 亦存在于细胞核小体重构和脱乙酰基(NuRD)复合物中^[20],提示 HDAC1 与 GATA-1 共同参与了红系分化成熟过程。本研究发现经 HDAC1 作用后在 HDAC1 表达水平下降的同时 GATA-1 明显升高,两者表达呈负相关趋势;正虚型(低危,中危-1)及瘀毒型(中危-2,高危)MDS 患者 BMMNCs 经扶正、祛邪中药干预后 HDAC1, GATA-1 水平呈现与 HDAC1 类同作用趋势,而不同中药组间无明显差异。

中医药治疗 MDS 在改善 MDS 患者临床症状、增效减毒方面的优势已被广泛证实。MDS 中医病名“髓毒劳”,病机为本虚标实,脾肾两虚、毒瘀内蕴,贯穿了 MDS 的整个发病过程,证型不外分为“正虚”、“瘀毒”两大类^[21-22]。课题组多年来依据临床中西医结合治疗 MDS 的经验,总结出 MDS 中医病机的脾肾亏虚、瘀毒内蕴论^[23]。药理研究也证实健脾补肾中药辨证施治可改善 MDS 患者造血刺激因子和造血抑制因子的失衡,促进骨髓造血干细胞增殖分化^[24]。同时,课题组基于健脾补肾活血解毒中药对 MDS 红系改善的有效性和安全性观察,以及其对组蛋白乙酰化差异性表达影响的前期结果^[25],进一步回顾整理了 140 例 MDS 患者的临床资料,筛选出太子参、菟丝子、女贞子、牡丹皮、白花蛇舌草、三七 6 味扶正、祛邪核心药物。其中太子参补益脾肺,益气生津,归肾、肝、脾经,菟丝子温补肝肾、益髓填精,女贞子滋补肝肾、清热养血,药力相对平和,此 3 味为健脾补肾主药;白花蛇舌草清热解毒,牡丹皮凉血止血生血,三七散瘀止血生血,此 3 味为活血解毒主药,全方补益肝肾,温而不燥,补而不滞,清热解毒,化瘀生血,瘀去而新血自安。本研究使用该复方中药醇提物及 HDAC1 (SAHA) 分别对 MDS 患者 BMMNCs 组蛋白乙酰化及红系转录因子水平影响的研究,发现经中药干预后 BMMNCs 中的 HDAC1 mRNA 和蛋白水平得到显著下调,GATA-1 mRNA 和

蛋白水平的上升,提示扶正、祛邪中药可能通过调控组蛋白乙酰化水平提高红系转录水平,从而改善红系增殖。同时,表观遗传药物 SAHA 干预后,MDS 患者 BMMNCs 中的 HDAC1 与 GATA-1 表达呈负相关趋势,且中药具有相类同的作用趋势,由此不仅说明可能存在 HDAC 调控红系转录的信号通路,也证明中药可能在该环节中发挥了作用,而表观遗传组蛋白乙酰化与红系转录间确切的相关性信号转导机制还需进一步的研究验证,中药在不同分型 MDS 组蛋白乙酰化与红系转录相关作用通路环节中未显现的作用差异也值得探讨。

[参考文献]

- [1] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社,2008:157-163.
- [2] Addès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes[J]. Lancet,2014,383(9936):2239-2251.
- [3] Masselli E, Varricchio L, Ghinassi B, et al. Class II a HDAC inhibitors reduce HDAC1 activity by off-target effects which reduce GATA1 expression in human erythroblasts expanded *ex-vivo* [J]. Blood, 2010; 4780. <http://www.bloodjournal.org/content/116/21/4780?ssoc-checked=true>.
- [4] Almeida A, Fenaux P, List A F, et al. Recent advances in the treatment of lower-risk non-del (5q) myelodysplastic syndromes (MDS) [J]. Leuk Res, 2017,52(11):50-57.
- [5] 申小惠,孙伟玲,鲍计章,等. 健脾补肾解毒方治疗骨髓增生异常综合征临床观察[J]. 上海中医药大学学报,2012,26(5):34-37.
- [6] 马传宝,翟晓冉,张家陪,等. 中西医结合治疗骨髓增生异常综合征的效果及对患者生存质量改善的影响[J]. 临床合理用药杂志,2017,10(20):59-60.
- [7] 马西虎,吴玉霞. 中西医结合治疗骨髓增生异常综合征 100 例临床观察[J]. 中医药导报,2015,21(18):58-60.
- [8] 陆嘉惠,胡令彦,周永明,等. 健脾补肾活血解毒法为主治疗骨髓增生异常综合征[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):204-206.
- [9] 陆嘉惠,孙伟玲,周永明,等. NF- κ B 介导的 MDS 双向凋亡机制与中医“正虚”、“瘀毒”病机相关性的实验研究[J]. 中医药信息,2010,27(5):100-103.
- [10] Valent P, Horny H P, Bennett J M, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference[J]. Leuk Res,2007, 31(6):727-736.

- [11] Leitch H A, Chan C, Leger C S, et al. Improved survival with iron chelation therapy for red blood cell transfusion dependent lower IPSS risk MDS may be more significant in patients with a non-RARS diagnosis [J]. *Leuk Res*, 2012, 36(11):1380-1386.
- [12] 黄振翘, 陈信义, 梁冰, 等. 实用中医血液病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 523.
- [13] 郝洪波, 任思坡, 谢晓东. 密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞方法的优化 [J]. *吉林医学*, 2012, 33(35):7619-7620.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 11-172.
- [15] 邓凤芸. 白花蛇舌草的体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中国民族民间医药*, 2016, 25(11): 7-9.
- [16] 浦权. 实用血液病学 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 491-523.
- [17] Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia*, 2014, 28(2): 241-247.
- [18] LIU Z, KAI D, LI L, et al. A novel histone deacetylase inhibitor Chidamide induces G₀/G₁ arrest and apoptosis in myelodysplastic syndromes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83(10): 1032-1037.
- [19] Fadilah S A, Cheong S K, Roslan H, et al. GATA-1 and GATA-2 gene expression is related to the severity of dysplasia in myelodysplastic syndrome [J]. *Leukemia*, 2002, 16(8): 1563-1565.
- [20] Varricchio L, Dell'Aversana C, Nebbioso A, et al. Identification of NuRSERY, a new functional HDAC complex composed by HDAC5, GATA1, EKLF and pERK present in human erythroid cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 50(5): 112-122.
- [21] 许鸣, 陆嘉惠. 骨髓增生异常综合征中医证型研究进展 [J]. *上海中医药杂志*, 2015, 49(12): 87-90.
- [22] 许鸣, 陆嘉惠. 骨髓增生异常综合征中西医结合临床与实验研究现状 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(2): 246-250.
- [23] 岳睿, 陆嘉惠. 试从脾肾亏虚、瘀毒内蕴论治骨髓增生异常综合征 [J]. *新中医*, 2014, 46(2): 15-17.
- [24] 王敬毅, 徐瑞荣, 周延峰. 中西医结合治疗骨髓增生异常综合征专家共识 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(1): 38-40.
- [25] ZENG Q, SHU J, HU Q, et al. Apoptosis in human myelodysplastic syndrome CD34⁺ cells is modulated by the upregulation of TLRs and histone H4 acetylation via a β -arrestin 1 dependent mechanism [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 340(1): 22-31.

[责任编辑 张丰丰]