

论 著

· 基础研究 ·

# 槐耳对人急性T淋巴细胞白血病CEM-C1细胞耐药性的逆转作用及机制

任丹薇, 龙思利, 覃祥, 牛亚娜, 钟芳芳, 刘静, 刘文君\*

西南医科大学附属医院儿科血液肿瘤病区/四川省出生缺陷临床医学研究中心, 四川泸州 646000

**[摘要]** **目的** 探讨槐耳能否逆转人急性T淋巴细胞白血病(T-ALL)细胞株CEM-C1细胞对糖皮质激素的耐药性及其可能的机制。**方法** 人CEM-C1、CEM-C7细胞经不同浓度槐耳处理后设为对照组(0  $\mu\text{g/ml}$ )及200、600  $\mu\text{g/ml}$ 槐耳处理组, T-ALL细胞株CEM-C1细胞设槐耳(100  $\mu\text{g/ml}$ )联合地塞米松(DEX, 12.5、25、50、100、200  $\mu\text{g/ml}$ )组。CCK-8法检测槐耳对各组细胞增殖的影响; 流式细胞术检测不同浓度(200、600  $\mu\text{g/ml}$ )槐耳对CEM-C1、CEM-C7细胞凋亡及细胞周期的影响; Western blotting检测CEM-C1、CEM-C7细胞中及CEM-C1细胞经不同浓度(200、600  $\mu\text{g/ml}$ )槐耳处理后MDR1、Pim3蛋白的表达水平; qRT-PCR检测CEM-C1、CEM-C7细胞中及CEM-C1细胞经不同浓度(200、600  $\mu\text{g/ml}$ )槐耳处理后Pim3 mRNA的表达情况。**结果** 槐耳呈剂量依赖性抑制CEM-C1、CEM-C7细胞增殖; 在CEM-C1细胞中, 与单用DEX比较, 槐耳联合DEX的耐药逆转倍数为1.34倍, 且槐耳联合低浓度DEX(12.5、25、50  $\mu\text{g/ml}$ )组CEM-C1细胞的增殖抑制率明显提高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 槐耳联合DEX各组的两药相互作用指数(CDI)均 $< 1$ 。与对照组比较, CEM-C1及CEM-C7细胞凋亡率随槐耳浓度的增加而升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 200、600  $\mu\text{g/ml}$ 槐耳处理CEM-C1、CEM-C7细胞48 h后, S期细胞比例增加,  $G_0/G_1$ 期细胞比例降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。CEM-C1细胞中MDR1、Pim3蛋白表达水平(分别为 $2.41 \pm 0.32$ 、 $0.39 \pm 0.10$ )及Pim3 mRNA表达水平(1.00)均明显高于CEM-C7细胞(分别为 $1.34 \pm 0.43$ 、 $0.13 \pm 0.05$ 及 $0.37 \pm 0.02$ ), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); CEM-C1细胞经200、600  $\mu\text{g/ml}$ 槐耳处理后, MDR1、Pim3蛋白及Pim3 mRNA表达水平均明显低于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 槐耳可抑制CEM-C1、CEM-C7细胞的增殖, 促进其凋亡, 并可部分逆转CEM-C1细胞对糖皮质激素的耐药性, 其机制可能与Pim3下调有关。

**[关键词]** 急性淋巴细胞白血病; 槐耳; Pim3; 耐药性

**[中图分类号]** R725.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0577-7402(2021)03-0213-08

**[DOI]** 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.03.01

## Effect of Huaier on reversing the drug resistance of CEM-C1 cells in human acute T lymphoblastic leukemia and its mechanism

Ren Dan-Wei, Long Si-Li, Qin Xiang, Niu Ya-Na, Zhong Fang-Fang, Liu Jing, Liu Wen-Jun\*

Department of Pediatric Hematology and Oncology Ward, Affiliated Hospital of Southwest Medical University/Sichuan Provincial Clinical Medical Research Center for Children with Birth Defects, Luzhou, Sichuan 646000, China

\*Corresponding author, E-mail: lwjlyfy@qq.com

This work was supported by the Sichuan Province Applied Basic Research Project (2019YJ0690), and the Luzhou Science and Technology Planning Project (2019-RCM-98)

**[Abstract]** **Objective** To investigate whether Huaier can reverse the drug resistance of CEM-C1 cells to glucocorticoid (GC) in human acute T lymphocytic leukemia (T-ALL) and its possible mechanism. **Methods** CEM-C1 and CEM-C7 cells were set as control group (0  $\mu\text{g/ml}$ ) and experimental groups (200 and 600  $\mu\text{g/ml}$ ) after treated with different concentrations of Huaier; T-ALL CEM-C1 cells were set as Huaier (100  $\mu\text{g/ml}$ ) combined with dexamethasone (DEX)(12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ ) groups; CCK-8 was used to detect the affect of Huaier on the inhibition rate to proliferation of each group of cells; Flow cytometry (FCM) was employed to detect the effect of different concentrations Huaier (200 and 600  $\mu\text{g/ml}$ ) on the apoptosis and cell cycle of CEM-C1 and CEM-C7 cells; Western blotting was performed to detect the MDR1 and Pim3 protein expression levels in CEM-C1, CEM-C7 cells and CEM-C1 cells treated with different concentrations of Huaier (200 and 600  $\mu\text{g/ml}$ ); qRT-PCR was used to detect

**[基金项目]** 四川省应用基础研究项目(2019YJ0690); 泸州市科技计划项目(2019-RCM-98)

**[作者简介]** 任丹薇, 医学硕士, 主要从事儿童血液疾病及肿瘤方面的研究。E-mail: 1105350211@qq.com

**[通信作者]** 刘文君, E-mail: lwjlyfy@qq.com

the expression level of Pim3 mRNA in CEM-C1 and CEM-C7 cells and CEM-C1 cells treated with different concentrations of Huaier (200 and 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). **Results** Huaier inhibited the proliferation of CEM-C1 and CEM-C7 cells in a dose-dependent manner; For CEM-C1 cells, compared with DEX alone, the drug resistance was reversed by 1.34 times in Huaier+DEX group, and Huaier (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) combined with low concentration of DEX (12.5, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) increased the proliferation inhibition rate of CEM-C1 cells ( $P<0.05$ ); the coefficient of drug interaction (CDI) values of all groups were  $<1$ . Compared with control group, the apoptosis rate of CEM-C1 and CEM-C7 cells increased significantly with the increase of Huaier concentration ( $P<0.05$ ). Compared with control group, the number of CEM-C1 and CEM-C7 cells decreased in  $G_0/G_1$  stage and increased in S stage in 200 and 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Huaier groups. The expression levels of MDR1 and Pim3 protein and Pim3 mRNA in CEM-C1 cells were higher than those of CEM-C7 cells ( $2.41 \pm 0.32$  vs.  $1.34 \pm 0.43$ ;  $0.39 \pm 0.10$  vs.  $0.13 \pm 0.05$ ;  $1.00$  vs.  $0.37 \pm 0.02$ , respectively,  $P<0.05$ ). Compared with control group, the expression levels of MDR1 and Pim3 proteins and Pim3 mRNA reduced obviously in CEM-C1 cells after treatment with 200 and 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Huaier ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Huaier can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of CEM-C1 and CEM-C7 cells, and partially reverse the resistance of CEM-C1 cells to GC, the mechanism may be related to the down-regulation of Pim3.

[Key words] acute lymphoblastic leukemia; Huaier; Pim3; drug resistance

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是儿童最常见的恶性肿瘤,约占15岁以下儿童确诊总数的25%,且近年来ALL的发病率逐年升高<sup>[1-3]</sup>。文献报道, T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)的无事件生存率(event-free survival, EFS)明显低于B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL),且T-ALL诱导失败、复发、早期死亡的风险高于B-ALL<sup>[4]</sup>。欧美国家T-ALL患儿的5年EFS(5-EFS)为65.7%~83.8%,我国为40.2%~66.0%,预后较差<sup>[5-6]</sup>。耐药及复发是ALL治疗失败的主要原因,也是阻碍ALL患儿长期存活的瓶颈<sup>[7]</sup>。其中,糖皮质激素(glucocorticoid, GC)耐药是导致儿童ALL治疗失败的主要原因之一<sup>[8]</sup>。儿童ALL初治病例中,约有20%的患儿对GC产生原发性耐药;而复发病例中,GC耐药率高达70%<sup>[9-10]</sup>。因此,寻找ALL耐药相关基因并制定克服ALL耐药的方案,已成为ALL临床研究的热点。

槐耳清膏是槐耳菌质的初提物,其主要活性成分是由6种单糖与18种氨基酸结合形成的多糖蛋白,具有调节免疫、抗肿瘤、抗病毒等作用<sup>[11-14]</sup>。另有研究发现,槐耳可逆转多种肿瘤的耐药性<sup>[15-17]</sup>,但目前尚无槐耳逆转ALL耐药的相关报道。莫罗尼鼠白血病病毒前病毒整合位点(provirus integrating site moloney murine leukemia virus, Pim)家族基因包括Pim1、Pim2及Pim3,编码丝氨酸/苏氨酸激酶,可整合到细胞信号网络中,并调节多种细胞行为,如细胞增殖、存活及迁移等,与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[18-19]</sup>。Pim3是新近发现且研究较少的一个Pim亚型,与胰腺癌等多种肿瘤耐药相关,可能参与了肿瘤耐药性的形成过程<sup>[20-21]</sup>。本研究以GC耐药细胞株CEM-C1及GC敏感细胞株CEM-C7为研究对象,探讨槐耳能否逆转ALL细胞对GC的耐药性及其可能机制,旨在探索改善ALL对GC耐药的新方

法,为优化儿童ALL治疗方案及改善患儿预后提供新思路。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人ALL细胞株CEM-C1、CEM-C7由四川大学华西第二医院马志贵教授馈赠。槐耳购自中国江苏启东盖天力药业有限公司;地塞米松(dexamethasone, DEX)购自国药集团容生制药有限公司;RPMI 1640培养液购自美国Hyclone公司;胎牛血清购自中国杭州四季青公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司;青霉素及链霉素双抗、总RNA提取试剂盒、CCK-8及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗购自上海碧云天公司;反转录试剂盒及实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒购自日本ToYoBo公司;GAPDH、Pim3引物购自上海生工生物工程股份有限公司;FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I 细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司;细胞周期检测试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司;兔抗人GAPDH一抗购自美国Proteintech公司;兔抗人多药耐药基因1(MDR1)、Pim3单克隆抗体一抗购自英国CST公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养及分组** 将CEM-C1、CEM-C7细胞悬浮于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素及0.1 mg/ml链霉素双抗的完全培养基中,并接种于培养瓶,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、含5% $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的培养箱中连续培养,每2 d更换1次培养液并传代,取对数生长期的细胞进行后续实验。CEM-C1、CEM-C7细胞经不同浓度(0、100、200、400、600、800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )槐耳处理24、48、72 h后,根据CCK-8实验确定48 h为干预时间,200、600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 槐耳为后续实验的干预浓度,100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 槐耳作为联合用药浓度与不同浓度(12.5、25、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )DEX联合作用

于CEM-C1细胞。

**1.2.2 CCK-8检测细胞的增殖抑制率** 收集对数生长期的CEM-C1、CEM-C7细胞,调整细胞密度为 $2 \times 10^5$ 个/ml,转移90  $\mu$ l细胞悬液至96孔板中,每孔加入10  $\mu$ l预设浓度的各组药物,使槐耳终浓度为50、100、200、400、600、800  $\mu$ g/ml,DEX终浓度为12.5、25、50、100、200  $\mu$ g/ml,以及100  $\mu$ g/ml槐耳联合不同浓度(12.5、25、50、100、200  $\mu$ g/ml)DEX,同时设置对照组(仅含培养基及细胞)及空白组(仅含培养基),每组设4个复孔,放入CO<sub>2</sub>培养箱内培养24、48、72 h后,每孔再加10  $\mu$ l CCK-8溶液,放入CO<sub>2</sub>培养箱内孵育4 h,用酶标仪在450 nm处测定各孔的光密度(OD)值。实验独立重复4次。细胞增殖抑制率(%)=1 - [(OD<sub>实验组</sub> - OD<sub>药物对照</sub>) / (OD<sub>对照组</sub> - OD<sub>空白组</sub>)]  $\times$  100%。采用GraphPad Prism7软件计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。耐药逆转倍数=耐药株的IC<sub>50</sub>/加药处理耐药株的IC<sub>50</sub>。两药相互作用指数(coefficient of drug interaction, CDI)=AB/(A  $\times$  B),其中AB为OD<sub>联合组</sub>/OD<sub>对照组</sub>,A、B分别为两种药物的OD<sub>单药组</sub>/OD<sub>对照组</sub>。若CDI<1,两药为协同作用,值越小协同作用越强;CDI=1,两药为相加作用;CDI>1,两药为拮抗作用,值越大拮抗作用越强<sup>[22]</sup>。

**1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡情况** 取对数生长期的CEM-C1、CEM-C7细胞,经不同浓度(0、200、600  $\mu$ g/ml)槐耳处理48 h后,用冷PBS洗涤2次,加入1  $\times$  结合缓冲液重悬细胞,调整细胞密度为 $3 \times 10^6$ 个/ml,取100  $\mu$ l细胞悬液于5 ml Falcon试管中,加入5  $\mu$ l FITC Annexin V及5  $\mu$ l PI,室温避光染色15 min,然后加入300  $\mu$ l结合缓冲液混匀,在1 h内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验独立重复3次。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞周期** 取对数生长期的CEM-C1、CEM-C7细胞,经不同浓度(0、200、600  $\mu$ g/ml)槐耳处理48 h后,用冷PBS洗2次,调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/ml,取1 ml单细胞悬液,弃上清,用70%的冷乙醇500  $\mu$ l悬浮细胞,4  $^{\circ}$ C过夜固定;PBS洗涤后加入500  $\mu$ l预先配制的PI/RNase A工作液混匀,室温、避光放置30~60 min,流式细胞仪检测488 nm波长处的红色荧光。实验独立重复3次。

**1.2.5 Western blotting检测细胞MDR1、Pim3蛋白的表达水平** 收集细胞,设置CEM-C1、CEM-C7细胞组及CEM-C1细胞经不同浓度(0、200、600  $\mu$ g/ml)槐耳处理组,按照全蛋白提取试剂盒说明书提取细胞全蛋白。BCA法测蛋白浓度,根据蛋白浓度取等量蛋白,加5  $\times$  SDS上样缓冲液煮沸5 min,进行SDS-PAGE电泳后将蛋白转移到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的PBST封闭1 h,经PBST充分洗涤10 min  $\times$  3次,MDR1、Pim3单克隆抗体均按

1:1000稀释。4  $^{\circ}$ C孵育过夜,充分洗涤后加山羊抗兔二抗,按1:2000稀释,室温孵育1 h,化学发光显影。采用Image J软件分析图像,以MDR1、Pim3蛋白条带灰度值与GAPDH蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。实验独立重复3次。

**1.2.6 qRT-PCR检测细胞中Pim3 mRNA的表达水平** 收集细胞,设置CEM-C1、CEM-C7细胞组及CEM-C1细胞经不同浓度(0、200、600  $\mu$ g/ml)槐耳处理组,用总RNA提取试剂盒提取总RNA,反转录为cDNA,荧光定量PCR法扩增目的基因及内参基因GAPDH。Pim3引物:正向5'-ACCGACTTCGACGGCAC-3',反向5'-TATCGTAGAGAAGCACGCC-3';GAPDH引物:正向5'-ATGCTGGCGCTGAGTACGTC-3',反向5'-GGTCATGAGTCCTCCACGATA-3'。qRT-PCR反应条件:95  $^{\circ}$ C预变性30 s;95  $^{\circ}$ C变性5 s,60  $^{\circ}$ C退火10 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因mRNA的相对表达水平。均设3个复孔,实验独立重复3次。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 20.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 槐耳对ALL细胞增殖的影响** CCK-8检测结果显示,用槐耳对CEM-C1及CEM-C7细胞处理24 h及72 h,100、200、400、600、800  $\mu$ g/ml槐耳组的增殖抑制率明显高于50  $\mu$ g/ml槐耳组;槐耳处理48 h,细胞增殖抑制率呈剂量依赖方式增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图1)。根据结果选用200、600  $\mu$ g/ml槐耳作为本实验的干预浓度,100  $\mu$ g/ml槐耳作为联合用药浓度。槐耳处理CEM-C1及CEM-C7细胞24、48、72 h后,CEM-C1细胞的IC<sub>50</sub>分别为2272.0、313.4、1275.0  $\mu$ g/ml,CEM-C7细胞的IC<sub>50</sub>分别为1406.0、757.5、1653.0  $\mu$ g/ml,表明槐耳处理48 h对CEM-C1及CEM-C7细胞增殖的抑制作用最强,因此后续实验选择48 h作为干预时间。

**2.2 槐耳对CEM-C1细胞耐药性的逆转作用** CCK-8检测结果显示,不同浓度(12.5、25、50、100、200  $\mu$ g/ml)DEX单独作用于两种细胞48 h后,CEM-C1细胞的IC<sub>50</sub>为98.89  $\mu$ g/ml,CEM-C7细胞的IC<sub>50</sub>为0.16  $\mu$ g/ml,依据公式计算CEM-C1细胞的耐药倍数是CEM-C7细胞的618.06倍,符合两种细胞的特性。槐耳(100  $\mu$ g/ml)+DEX处理CEM-C1细胞后的IC<sub>50</sub>为73.75  $\mu$ g/ml,耐药逆转倍数为1.34倍,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而联合用药对CEM-C7

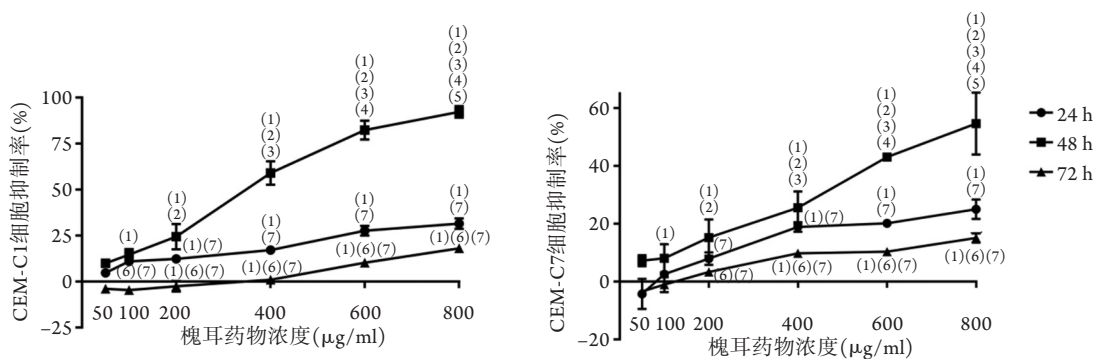


图1 槐耳对CEM-C1及CEM-C7细胞增殖的影响(n=4)

Fig.1 Effect of Huaier on the proliferation of CEM-C1 and CEM-C7 cells (n=4)

与50 μg/ml槐耳组比较, (1)P<0.05; 与100 μg/ml槐耳组比较, (2)P<0.05; 与200 μg/ml槐耳组比较, (3)P<0.05; 与400 μg/ml槐耳组比较, (4)P<0.05; 与600 μg/ml槐耳组比较, (5)P<0.05。与24h相比, (6)P<0.05; 与48h相比, (7)P<0.05。

细胞无明显影响。与单用DEX各组比较, 100 μg/ml槐耳联合低浓度(12.5、25、50 μg/ml)DEX提高了CEM-C1细胞的增殖抑制率, 差异有统计学意义(P<0.05, 表1); 各浓度DEX联用槐耳的CDI均<1, 表明两药具有协同作用。

2.3 槐耳对CEM-C1、CEM-C7细胞凋亡的影响  
流式细胞术检测结果显示, 随着槐耳浓度的增加, CEM-C1及CEM-C7细胞的凋亡率逐渐增高, 与对照组(0 μg/ml槐耳)比较差异有统计学意义(P<0.05, 表2)。

表1 DEX+槐耳对CEM-C1细胞增殖抑制率的影响( $\bar{x}\pm s$ , n=4)

Tab.1 Effect of DEX+Huaier on the inhibition ratio to CEM-C1 cells proliferation ( $\bar{x}\pm s$ , n=4)

DEX浓度(μg/ml)	细胞增殖抑制率(%)		CDI	t/Z	P
	DEX组	100 μg/ml槐耳+DEX组			
12.5	10.020 ± 0.783	20.820 ± 2.224	0.847 ± 0.108	-9.163	0.001
25	13.850 ± 1.302	25.140 ± 3.352	0.817 ± 0.121	-6.282	0.004
50	23.160 ± 5.649	32.240 ± 2.353	0.816 ± 0.120	-2.968	0.025
100	48.410 ± 6.810	58.280 ± 4.428	0.768 ± 0.240	-2.429	0.051
200	74.000 ± 2.593	77.190 ± 0.553	0.794 ± 0.190	-2.406	0.088

CDI. 两药相互作用指数

表2 不同浓度槐耳对CEM-C1及CEM-C7细胞凋亡率的影响(% ,  $\bar{x}\pm s$ , n=3)

Tab.2 Effect of different concentrations of Huaier on the apoptosis of CEM-C1 and CEM-C7 cells (% ,  $\bar{x}\pm s$ , n=3)

槐耳浓度	CEM-C1细胞凋亡率	CEM-C7细胞凋亡率
0 μg/ml	9.937 ± 0.966	7.810 ± 0.850
200 μg/ml	27.780 ± 0.528 <sup>(1)</sup>	26.643 ± 1.310 <sup>(1)</sup>
600 μg/ml	35.577 ± 1.258 <sup>(1)(2)</sup>	34.820 ± 0.697 <sup>(1)(2)</sup>
F	556.401	590.162
P	<0.001	<0.001

与0 μg/ml槐耳组比较, (1)P<0.05; 与200 μg/ml槐耳组比较, (2)P<0.05。

2.4 不同浓度槐耳对CEM-C1细胞周期的影响  
流式细胞术检测结果显示, 200、600 μg/ml槐耳处理CEM-C1、CEM-C7细胞48 h后, S期细胞比例比对照组增高, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例比对照组降低, 差异有统计学意义(P<0.05), 各组细胞的G<sub>2</sub>/M期比例差异无统计学意义(P>0.05, 表3)。

2.5 CEM-C1、CEM-C7细胞中及槐耳处理后

CEM-C1细胞中MDR1、Pim3蛋白表达水平比较  
Western blotting检测结果显示, CEM-C1细胞中MDR1蛋白表达水平(2.41 ± 0.32)明显高于CEM-C7细胞(1.34 ± 0.43), 差异有统计学意义(t=3.45, P<0.05, 图2A)。CEM-C1细胞经200、600 μg/ml槐耳处理后, MDR1蛋白表达水平均低于0 μg/ml槐耳组(1.62 ± 0.03、1.34 ± 0.16 vs. 1.92 ± 0.10), 差异有统计学意义(P<0.05, 图2B)。CEM-C7细胞中Pim3蛋白表达水平(0.13 ± 0.05)明显低于CEM-C1细胞(0.39 ± 0.10), 差异有统计学意义(t=3.94, P<0.05, 图2C)。CEM-C1细胞经200、600 μg/ml槐耳处理后, Pim3蛋白表达水平均低于0 μg/ml槐耳组(1.05 ± 0.14、0.75 ± 0.13 vs. 1.48 ± 0.33), 差异有统计学意义(P<0.05, 图2D)。

2.6 CEM-C1、CEM-C7细胞中及槐耳处理后  
CEM-C1细胞中Pim3 mRNA表达水平的比较  
qRT-PCR结果显示, CEM-C7细胞的Pim3 mRNA相对

表3 不同浓度槐耳对CEM-C1及CEM-C7细胞周期的影响(% ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab.3 Effects of different concentrations of Huaier on the cell cycle of CEM-C1 and CEM-C7 cells (% ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

槐耳浓度( $\mu\text{g/ml}$ )	CEM-C1细胞周期			CEM-C7细胞周期		
	S	G <sub>2</sub> /M	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>
0	34.807 $\pm$ 1.305	9.967 $\pm$ 0.112	55.227 $\pm$ 1.416	37.823 $\pm$ 6.362	8.483 $\pm$ 1.292	53.693 $\pm$ 7.547
200	39.363 $\pm$ 0.785 <sup>(1)</sup>	12.790 $\pm$ 1.523	47.847 $\pm$ 1.250 <sup>(1)</sup>	61.010 $\pm$ 1.715 <sup>(1)</sup>	6.010 $\pm$ 0.306	32.977 $\pm$ 1.486 <sup>(1)</sup>
600	44.253 $\pm$ 2.975 <sup>(1)</sup>	7.663 $\pm$ 1.438	48.083 $\pm$ 1.857 <sup>(1)</sup>	41.617 $\pm$ 1.364 <sup>(1)</sup>	10.680 $\pm$ 0.528	47.553 $\pm$ 0.970 <sup>(1)</sup>
F	17.985	13.481	22.567	30.752	5.725	16.955
P	0.028	0.059	0.001	<0.001	0.068	0.003

与0  $\mu\text{g/ml}$ 槐耳组比较, (1) $P < 0.05$ 。

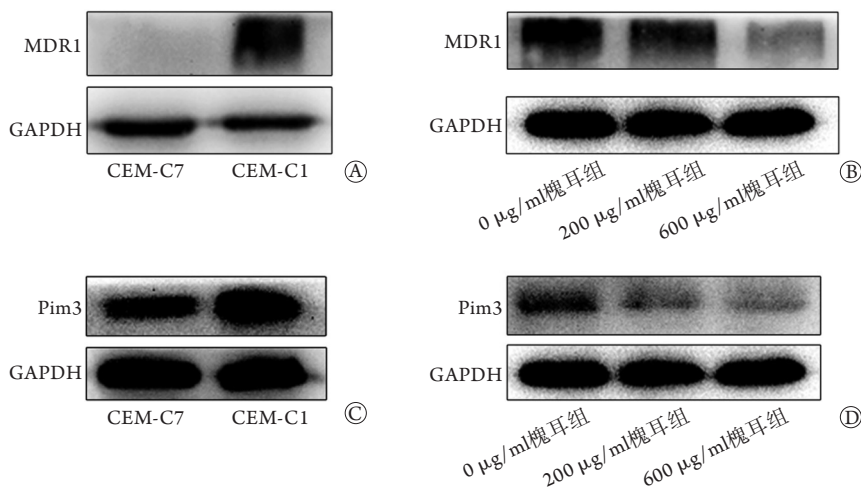


图2 各组细胞中MDR1、Pim3蛋白表达水平比较

Fig.2 Comparison of the protein expression levels of MDR1, Pim3 in each group

A. CEM-C1及CEM-C7细胞中MDR1蛋白表达水平比较; B. 不同浓度槐耳对CEM-C1细胞中MDR1蛋白表达的影响; C. CEM-C1及CEM-C7细胞中Pim3蛋白表达水平比较; D. 不同浓度槐耳对CEM-C1细胞中Pim3蛋白表达的影响

表达水平低于CEM-C1细胞( $0.37 \pm 0.02$  vs.  $1.00$ ), 差异有统计学意义( $t=58.88$ ,  $P < 0.05$ , 图3A); 与0  $\mu\text{g/ml}$ 槐耳组( $1.00$ )比较, 200、600  $\mu\text{g/ml}$ 槐耳组CEM-C1细胞中Pim3 mRNA的表达水平均明显降低

(分别为 $0.79 \pm 0.12$ 、 $0.59 \pm 0.10$ ), 且600  $\mu\text{g/ml}$ 槐耳组明显低于200  $\mu\text{g/ml}$ 槐耳组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图3B)。

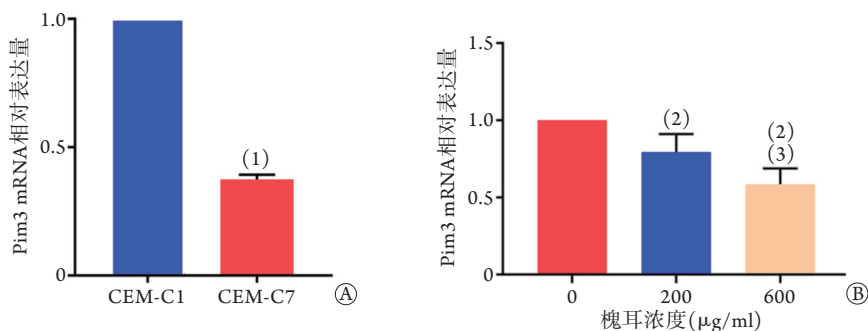


图3 各组细胞中Pim3 mRNA表达水平比较 ( $n=3$ )

Fig.3 Comparison of the expression levels of Pim3 mRNA in each group ( $n=3$ )

A. CEM-C1及CEM-C7细胞中Pim3 mRNA表达水平比较, 与CEM-C1细胞比较, (1) $P < 0.05$ ; B. 不同浓度槐耳对CEM-C1细胞中Pim3 mRNA表达的影响, 与0  $\mu\text{g/ml}$ 槐耳组比较, (2) $P < 0.05$ ; 与200  $\mu\text{g/ml}$ 槐耳组比较, (3) $P < 0.05$ 。

### 3 讨 论

目前对肿瘤的治疗多采用放疗、化疗、手术等综合治疗, 但随着对中草药认识的深入, 中草药在

肿瘤治疗中也发挥了独特的作用, 与化疗药物联合应用可增效解毒、延长生命、改善患者生存状态, 已成为近年来研究的热点。槐耳又名槐栓菌, 为寄生于槐树上的木耳, 是一种非常重要的药用真菌,

始载于《唐本草》<sup>[23]</sup>。槐耳清膏作为槐耳菌质的初提物,通过加入相应的辅料、烘干可制作成槐耳颗粒。槐耳因具有抗肿瘤作用,现已广泛应用于原发性肝癌、胃癌、乳腺癌等肿瘤的辅助治疗<sup>[24-26]</sup>。单中心研究发现,槐耳颗粒治疗成人慢性粒细胞白血病慢性期患者的总有效率可达80%<sup>[27]</sup>。本研究发现,槐耳可剂量依赖性地抑制CEM-C1、CEM-C7细胞的增殖并促进其凋亡,表明槐耳对ALL细胞具有抗肿瘤效应。有研究表明,槐耳可逆转肝癌、胃癌等肿瘤细胞的耐药性<sup>[28-30]</sup>。Qu等<sup>[31]</sup>的研究发现,槐耳可增强伊马替尼在Ikaros基因亚型6(ikaros isoform 6, Ik6)阳性及Ph染色体阳性的急性淋巴细胞白血病(Ik6<sup>+</sup>Ph<sup>+</sup>ALL)中的敏感性。本研究发现,与单用DEX比较,100 μg/ml槐耳联合DEX可进一步抑制CEM-C1细胞的增殖,耐药逆转倍数为1.34倍。与对照组(0 μg/ml槐耳)比较,200、600 μg/ml槐耳组的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例降低,S期细胞比例增高,提示槐耳可在一定程度上阻滞细胞的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,减少细胞分裂增殖,从而促进细胞凋亡,部分逆转CEM-C1细胞对GC的耐药性。本研究还发现,与GC敏感株CEM-C7细胞比较,GC耐药株CEM-C1细胞中多药耐药基因MDR1呈高表达,经槐耳处理后,CEM-C1细胞中MDR1的表达呈剂量依赖性的下降,与童琳等<sup>[12]</sup>在肝癌中的研究结果相似。以上结果表明,槐耳可在一定程度上逆转ALL细胞的耐药性,并增强CEM-C1细胞对DEX的敏感性。

Pim3基因最初是通过病毒插入筛选发现的,该基因可促进淋巴瘤的发展<sup>[32-33]</sup>。作为Pim家族中的一员,Pim3位于22号染色体(22q13),是发现最晚、研究最少的一个亚型<sup>[34-35]</sup>。Pim3参与介导多种肿瘤的发生发展,在胃癌、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、急性白血病及淋巴瘤等恶性肿瘤中均呈高表达<sup>[36-41]</sup>。还有研究发现抑制Pim3能抑制前列腺癌、肝癌、胃癌等肿瘤的进展<sup>[36-37,42]</sup>。作为新近发现且研究较少的一个亚型,Pim3还被发现与多种肿瘤耐药相关:Guo等<sup>[37]</sup>发现,沉默Pim3能逆转胃癌耐药;Xu等<sup>[20]</sup>发现,沉默Pim3可抑制胰腺癌细胞的增殖并增加其对吉西他滨化疗的敏感性。本研究结果显示,耐药细胞CEM-C1中Pim3蛋白及mRNA表达水平平均高于敏感细胞CEM-C7,提示Pim3可能参与介导了ALL的耐药;采用不同浓度槐耳处理CEM-C1细胞后,其Pim3蛋白及mRNA表达水平明显降低,表明Pim3可能是槐耳逆转ALL耐药性的靶点之一。因此,以Pim3为目的基因的基因抑制可能为逆转ALL耐药提供新的治疗策略及治疗靶点。

综上所述,槐耳作为一种中成药制剂,可抑制

ALL细胞的增殖并促进其凋亡,调节细胞周期,增强白血病细胞对GC的敏感性,其作用机制可能与下调Pim3有关。本研究结果为槐耳辅助治疗ALL提供了新的理论依据,槐耳抑制Pim3基因的表达可能是一种潜在的治疗ALL耐药的有效方法,但其具体机制尚需进一步深入研究。

#### 【参考文献】

- [1] Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, *et al*. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study[J]. *Lancet Haematol*, 2018, 5(1): e14-e24.
- [2] Smith MA, Altekruse SF, Adamson PC, *et al*. Declining childhood and adolescent cancer mortality[J]. *Cancer*, 2014, 120(16): 2497-2506.
- [3] Xu YZ, Wang XG, Chen LR. Fusion genotype analysis of 248 children with acute lymphoblastic leukemia in Henan Province[J]. *J Zhengzhou Univ (Med Sci)*, 2019, 54(3): 470-473. [徐一卓, 王西阁, 陈力溶. 河南地区248例儿童急性淋巴细胞白血病融合基因类型分析[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2019, 54(3): 470-473.]
- [4] Zhan SZ, Zhang LP, Zeng HM. Treatment and prognosis of childhood acute T lymphocytic leukemia[J]. *J Clin Pediatr*, 2019, 37(8): 632-636. [占思政, 张乐萍, 曾慧敏. 儿童急性T淋巴细胞白血病治疗及预后[J]. *临床儿科杂志*, 2019, 37(8): 632-636.]
- [5] Asselin BL, Devidas M, Wang C, *et al*. Effectiveness of high-dose methotrexate in T-cell lymphoblastic leukemia and advanced-stage lymphoblastic lymphoma: a randomized study by the Children's Oncology Group (POG 9404)[J]. *Blood*, 2011, 118(4): 874-883.
- [6] Cui L, Li ZG, Chai YH, *et al*. Outcome of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia treated with CCLG-ALL 2008: the first nation-wide prospective multicenter study in China[J]. *Am J Hematol*, 2018, 93(7): 913-920.
- [7] Yu HT, Fu MJ. Research progress of Chinese materia medica for reversing tumor multidrug resistance[J]. *Clin J Chin Med*, 2019, 11(27): 71-74. [于海涛, 付明娟. 中药逆转肿瘤多药耐药性的研究进展[J]. *中医临床研究*, 2019, 11(27): 71-74.]
- [8] Zeng X, Yu J. Research progress on the genetic mutation related to the relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Mod Med Heal*, 2018, 34(23): 3663-3666. [曾星, 于洁. 儿童急性淋巴细胞白血病复发相关基因突变的研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2018, 34(23): 3663-3666.]
- [9] Gao J, Ma ZG. Glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia: molecular mechanisms and related issues[J]. *J Clin Pediatr*, 2010, 28(5): 407-409. [高举, 马志贵. 急性淋巴细胞白血病糖皮质激素耐药的分子机制及其相关问题[J]. *临床儿科杂志*, 2010, 28(5): 407-409.]
- [10] Long SL, Liu WJ. Research progress of signal transduction pathways associated with glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Int J Blood Transfus Hematol*, 2018, 41(5): 441-445. [龙思利, 刘文君. 急性淋巴细胞白血病糖皮质激素耐药相关信号通路的研究进展[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2018, 41(5): 441-445.]
- [11] Yuan SJ, He XS, Yuan XH, *et al*. Antioxidant activity evaluation and low-polarity components analysis of coriolus versicolor and trametes robiniophila[J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(6):

- 1-5. [袁诗俊, 贺新生, 袁小红, 等. 云芝与槐耳抗氧化活性评价及低极性组分GC-MS成分分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 1-5.]
- [12] Tong L, Chang MJ, Hu J, *et al.* Experimental research of Huaier aqueous extract on lung cancer tumor growth inhibition in nude mice[J]. *Chin J Clin Med*, 2019, 26(2): 205-208. [童琳, 常美佳, 胡洁, 等. 槐耳清膏能抑制裸鼠肺癌细胞的增殖活性[J]. 中国临床医学, 2019, 26(2): 205-208.]
- [13] Lu MQ, Lu HY, Feng XS, *et al.* Inhibition of xenografted human MCF-7 cells in nude mice and regulation of miR-126 expression by Huaier cream[J]. *J Southeast Univ (Med Sci Ed)*, 2019, 38(2): 328-332. [鲁明骞, 陆海燕, 冯雪松, 等. 槐耳清膏对乳腺癌MCF-7细胞裸鼠移植瘤的抑制作用及其与调控miR-126表达的关系[J]. 东南大学学报(医学版), 2019, 38(2): 328-332.]
- [14] Liu QJ, Gao X, Qiu B, *et al.* Protective effect of extractum trametes robiniophila murr on puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury in vit ro of mice and its mechanism[J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2019, 45(5): 1020-1024, 1194. [刘青菊, 高欣, 邱兵, 等. 槐耳清膏对嘌呤霉素氨基核苷所致体外小鼠肾小球足细胞损伤的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(5): 1020-1024, 1194.]
- [15] Cheng WH, Wang JY, Ying ZH, *et al.* Reversal effect of polysaccharide of trametes robininophila murr(ps-t) and TOR in human lung adenocarcinoma cell with resistance to cisplatin[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2017, 19(2): 23-25. [程万宏, 王艳俊, 应朝辉, 等. 槐耳清膏和TOR逆转人肺腺癌细胞顺铂耐药性实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(2): 23-25.]
- [16] Lu MQ, Lu HD, Lu ZX, *et al.* Effect of Huaier on proliferation and platinum resistance of human lung denocarcinoma A549/DDP cell line[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2016, 34(9): 2185-2187. [鲁明骞, 卢宏达, 卢忠心, 等. 槐耳清膏对人肺腺癌A549/DDP细胞增殖的影响及顺铂耐药逆转作用[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(9): 2185-2187.]
- [17] Zhang ZG, Liu B, Liang WF, *et al.* Preliminary study on reversal of sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by Huaier granule[J]. *J Nangjing Univ Tradit Chin Med*, 2020, 36(1): 83-87. [张正光, 刘冰, 梁伟锋, 等. 槐耳颗粒逆转肝癌细胞对索拉非尼耐药的初步研究[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(1): 83-87.]
- [18] Jinesh GG, Mokkupati S, Zhu K, *et al.* Pim kinase isoforms: Devils defending cancer cells from therapeutic and immune attacks[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(11): 1203-1213.
- [19] Qi Q, Pan YF, Han SW, *et al.* PIM3 functions as oncogenic factor and promotes the tumor growth and metastasis in colorectal cancer[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2019, 302(9): 1552-1560.
- [20] Xu DP, Cobb MG, Gavilano L, *et al.* Inhibition of oncogenic Pim-3 kinase modulates transformed growth and chemosensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine[J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(6): 492-501.
- [21] Chauhan SS, Warfel NA. Targeting PIM kinases to oppose hypoxia-mediated therapeutic resistance[J]. *Oncoscience*, 2018, 5(9/10): 254-255.
- [22] Yuan SJ. Establishment of new method for quantitatively calculating synergistic, additive and antagonistic effect in multiple-drug combination[J]. *Chin J Pharm Toxicol*, 2016, 30(12): 1316-1332. [袁守军. 多药合用药效学协同、相加和拮抗定量计算新方法的建立[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(12): 1316-1332.]
- [23] Zhao GP, Dai S, Chen RS, *et al.* The dictionary of Chinese herbal medicine[M]. 2nd ed. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2006: 873. [赵国平, 戴慎, 陈仁寿, 等. 中药大辞典[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 873.]
- [24] Zhang Y, Wang X, Chen T. Efficacy of Huaier granule in patients with breast cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2019, 21(5): 588-595.
- [25] Yu J, Wu Y, Cai Y. Clinical study of Huaier granules combined with S-1 monotherapy for elderly patients with advanced gastric cancer[J]. *Pract J Cancer*, 2019, 34(9): 1505-1507. [余皎, 吴驭, 蔡懿. 槐耳颗粒联合替吉奥治疗老年晚期胃癌的临床疗效观察[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(9): 1505-1507.]
- [26] Chen Q, Shu C, Laurence AD, *et al.* Effect of Huaier granule on recurrence after curative resection of HCC: a multicentre, randomised clinical trial[J]. *Gut*, 2018, 67(11): 2006-2016.
- [27] Qiu ZC, Chen P, Hu Q. Effect of instant powder of Jinke upon cytokine in the treatment of chronic myeloid leukemia[J]. *Chin Cancer*, 2000, (12): 50-51. [邱仲川, 陈珮, 胡琦. 金克对慢性粒细胞性白血病细胞因子的影响[J]. 中国肿瘤, 2000, (12): 50-51.]
- [28] Xu ZY, Cheng XD, Du YA, *et al.* An experimental study of the Huaier role in reversing multidrug resistance of chemo-resistant gastric cancer cells[J]. *J Chin Oncol*, 2016, 22(2): 129-133. [徐志远, 程向东, 杜义安, 等. 槐耳清膏逆转人胃癌耐药细胞多药耐药性的实验研究[J]. 肿瘤学杂志, 2016, 22(2): 129-133.]
- [29] Yu Z, Wu T, Zhang Y. The reversal effects of trametes robiniophila murr. on multidrug resistance in resistant human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402/5-Fu[J]. *J Chin Oncol*, 2013, 19(6): 443-447. [喻喆, 吴涛, 张阳. 槐耳清膏体外逆转人肝癌耐药细胞BEL-7402/5-Fu多药耐药性[J]. 肿瘤学杂志, 2013, 19(6): 443-447.]
- [30] Tang JN, Cheng XD, Xu ZY, *et al.* Inhibition of Huaierqing Paste on gastric carcinoma with peritoneummetastasis in nude mouse based on negative regulation on PI3K/Akt pathway[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2016, 31(11): 4468-4471. [汤加宁, 程向东, 徐志远, 等. 槐耳清膏负性调控PI3K/Akt通路抑制裸鼠胃癌腹膜转移[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4468-4471.]
- [31] Qu P, Han J, Qiu YN, *et al.* Huaier extract enhances the treatment efficacy of imatinib in Ik6<sup>+</sup>Ph<sup>+</sup> acute lymphoblastic leukemia[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109071.
- [32] Malone T, Schäfer L, Simon N, *et al.* Current perspectives on targeting PIM kinases to overcome mechanisms of drug resistance and immune evasion in cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 207: 107454.
- [33] Fan RF, Zou LY, Hao XL, *et al.* Pim-1 kinase inhibitor SMI-4a inhibits proliferation and induces apoptosis in U937 cells[J]. *Chin J Pathophys*, 2017, 33(9): 1625-1630. [范蕊芳, 邹丽媛, 郝秀兰, 等. Pim-1激酶抑制剂SMI-4a抑制U937细胞增殖并诱导凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(9): 1625-1630.]
- [34] Cervantes-Gomez F, Lavergne B, Keating MJ, *et al.* Combination of Pim kinase inhibitors and Bcl-2 antagonists in chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2016, 57(2): 436-444.
- [35] Zhou W, Ma XF, Ge R. Expressions of Moloney mouse leukemia virus pre-viral integration stage (PIM)-1, (PIM)-3

- and protooncogene C-MYC[J]. Chin J Gerontol, 2016, 36(19): 4803-4804. [周为, 马新福, 戈锐. 胃腺癌中莫洛尼鼠白血病病毒前病毒整合期-1、-3和原癌基因C-MYC的表达[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(19): 4803-4804.]
- [36] Wang JQ, Lao LJ, Zhao H, *et al.* Serine threonine kinase Pim-3 regulates STAT3 pathway to inhibit proliferation of human liver cancers[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(2): 348-355.
- [37] Guo H, Dong J, Hu S, *et al.* Biased random walk model for the prioritization of drug resistance associated proteins[J]. Sci Rep, 2015, 5: 10857.
- [38] Aziz AUR, Farid S, Qin KR, *et al.* PIM kinases and their relevance to the PI3K/AKT/mTOR pathway in the regulation of ovarian cancer[J]. Biomolecules, 2018, 8(1): E7.
- [39] Zhang XN, Song MQ, Kundu JK, *et al.* PIM kinase as an executional target in cancer[J]. J Cancer Prev, 2018, 23(3): 109-116.
- [40] Li Q, Jiang CW, Wang Y, *et al.* Resibufogenin suppresses tumor growth and inhibits glycolysis in ovarian cancer by modulating PIM1[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2019, 392(12): 1477-1489.
- [41] Liu LH, Lai QN, Chen JY, *et al.* Overexpression of pim-3 and protective role in lipopolysaccharide-stimulated hepatic stellate cells[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(29): 8858-8867.
- [42] Mumenthaler SM, Ng PYB, Hodge A, *et al.* Pharmacologic inhibition of Pim kinases alters prostate cancer cell growth and resensitizes chemoresistant cells to taxanes[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(10): 2882-2893.

(收稿日期: 2020-06-12; 修回日期: 2020-12-31)

(责任编辑: 张小利)