

- 血平胆证模型的评价研究[J]. 中国中医药基础杂志, 2011, 17(7): 746.
- [4] 苗明三, 朱飞鹏. 实验药理学研究动物模型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 99.
- [5] 潘文彬. 胆主疏泄的生理病理及实验研究[J]. 湖南中医学院学报, 1993, 13(2): 10.
- [6] 孙继军, 张登本, 李林东, 等. 大鼠胆道梗阻的唾液免疫学研究[J]. 陕西中医, 2004, 25(7): 665.
- [7] 林传权, 陈玉龙, 李磊, 等. 利胆平胆胆道大管唾液蛋白分泌改变及其机制的探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5): 509.
- [8] 赵继山, 余克强, 孙继军, 等. 中医辨证病理生理状态下唾液代谢组研究[J]. 四川中医, 2011, 29(3): 45.
- [9] 陈德珍, 魏晓新, 程中春, 等. 肝胆证病人唾液溶菌酶和唾液流速测定及分析[J]. 江苏中医, 1996, 17(11): 42.
- [10] 王娟娟, 武伟敏, 杨淑芳. 慢性肾衰竭与唾液白蛋白的关系[J]. 辽宁中医杂志, 1997, 24(8): 541.
- [11] 丁维俊, 杨红霞, 杨杰. 肝胆证患者唾液菌群初步研究[J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(1): 43.
- [12] 李林东, 孙继军. 胆汁与胆管的免疫相关性研究[J]. 现代中西医, 2004, 24(1): 18.
- [13] 孙继军, 张登本, 李林东, 等. 大鼠胆道梗阻的唾液免疫学研究[J]. 中医学刊, 2004, 22(6): 1611.
- [14] 郭教义, 张登本, 马 琳, 等. 102 例慢性肾性水肿患者唾液代谢组学变化初步观察[J]. 中医杂志, 1999, 30(5): 37.

针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复蛋白 POL β 的影响

于冬冬¹, 路 政^{2*}, 王延超³, 曹大明³, 滕迎春³, 李建伟³

(1. 河南中医药大学针灸推拿学院, 河南 郑州 450008;

2. 河南中医药大学国际教育学院, 河南 郑州 450008;

3. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450008)

摘要:目的: 以荷瘤小鼠为研究对象, 通过观察针灸干预后荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复蛋白 DNA 聚合酶 β (POL β) 的表达、蛋白水平以及 mRNA 转录情况, 探讨针灸改善荷瘤小鼠骨髓抑制的分子生物学机制, 为临床针灸治疗恶性肿瘤患者化疗所致骨髓抑制提供实验依据。方法: 选取清洁级、雄性昆明种小鼠 210 只, 自由饮食喂养 3~4 周后皮下植瘤, 接种 7 天后, 按体重 (22 ± 2) g, 腹腔注射 0.8 cm 左右的小鼠 192 只, 随机分为荷瘤对照组、荷瘤针刺组、荷瘤艾灸组各 48 只; 1 次性腹腔注射环磷酰胺 150 mg/kg 造成骨髓抑制模型。荷瘤空白组小鼠腹腔注射同体积生理盐水。荷瘤针刺组、荷瘤艾灸组采取大鼠、小鼠、足三里, 分别进行针刺、艾灸。荷瘤空白组、荷瘤模型组每日隔日抓取固定, 不作任何治疗。各组分别于 2~6 d 用免疫组化法、Western Blot 法、Real-time PCR 法观察荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 聚合酶 β (POL β) 表达的动态变化。结果: 针刺和艾灸可以明显上调环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CTX) 化疗所致荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 修复蛋白 pol β 的表达含量, 促进荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 损伤的碱基切除修复, 进而减轻因 CTX 化疗所致的骨髓抑制。结论: 通过针刺和艾灸干预, 提高了荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 的碱基切除修复能力, 保护因化疗引起的骨髓造血细胞损伤, 是针灸改善荷瘤小鼠化疗所致骨髓抑制, 保护骨髓造血功能的重要机制之一。选用荷瘤小鼠, 目的是使荷瘤小鼠体质更接近临床肿瘤患者, 可为肿瘤临床提供新的实验研究治疗思路和依据。

关键词: 针灸; 荷瘤小鼠; 环磷酰胺; 骨髓细胞 DNA;

DOI 标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2016.08.087

中图分类号: R245.3; R2-03 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2016)08-2021-04

化疗是恶性肿瘤综合治疗中较为重要的手段之一, 但是其在发挥抗肿瘤作用的同时, 也带来了一系列的不良反应^[1], 尤其对机体增殖旺盛的骨髓造血干细胞及造血微环境造成明显损害, 造成 DNA 的损伤^[2-3], 产生骨髓抑制, 外周血白细胞减少等毒副作用。而 DNA 修复相关基因是影响恶性肿瘤细胞化疗反应的重要因素^[4], 前期研究发现针灸能明显上调正常小鼠骨髓细胞 DNA

修复蛋白 POL β 的表达, 促进 DNA 的合成和修复, 保护骨髓细胞, 从而抵抗环磷酰胺的化疗损伤^[5]。本研究在前期研究的基础上, 为了更贴近临床肿瘤患者, 选用荷瘤小鼠为研究对象, 运用免疫组化法、Western Blot 法、Realtime PCR 法观察荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 聚合酶 β (POL β) 表达的变化, 揭示针灸保护骨髓造血细胞, 减轻骨髓抑制的分子生物学机制, 为临床研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物及分组 选用清洁级雄性昆明种 (KM) 小鼠 (由郑州大学医学院提供, 许可证号: 2010-0002) 210 只, 按体重随机分到荷瘤空白组、荷瘤模型组、荷瘤针刺组、荷瘤艾灸组, 48 只/组, 8 只/笼。小鼠在实验室中自由饲养 3 天后进行植瘤 (温度 20~25℃, 相对湿度 60% 左右)。

1.2 试剂 环磷酰胺 (0.2g/瓶 山西普德药业有限公司), 中性磷

收稿日期: 2015-11-22; 修回日期: 2016-05-30

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81273035)

作者简介: 于冬冬 (1983-), 男 (汉族), 河南项城人, 河南中医药大学讲师, 博士学位, 主要从事针灸抗放化疗消化系统毒副作用的研究工作。

* 通讯作者简介: 路 政 (1984-), 女 (汉族), 河南新乡人, 河南中医药大学教授, 博士研究生导师, 博士学位, 主要从事针灸抗放化疗毒副作用的研究工作。

酸盐缓冲液(PBS)、二氨基联苯胺显色液(DAB)液、鼠抗人 POLB 单抗抗体、S-P 免疫组化试剂盒、HRP 辣根过氧化物酶等、PVDF 膜、孔径为 0.45 μm 过硫酸铵等试剂;蛋白预染 Mark-er;蛋白浓度的定量试剂盒、BCA 法蛋白定量试剂盒;电泳缓冲液及丙烯酰胺(29:1);其它试剂、电泳仪,型号:mini protean 3 cell 发光剂,ECLTM western blotting detection,货号 RPN2106 等。

1.3 仪器 奥林巴斯双目光学显微镜、薄片离心机 SHANDON、冰箱、XW-80 A 型振荡器、K10CD 型干式恒温器、BDC-280e 型伊来克斯冷藏冰箱、低温冷冻离心机、ABI-7500 型 Real-time 检测仪、电热干烘箱、孵育盒、MicromlM340E 石蜡切片仪、不锈钢高压锅、电热干燥箱、水浴锅、恒温箱、pH 计等。

2 方法

2.1 模型制作方法 选用生长良好 S180 肉瘤细胞小鼠,对其同窝进行消毒后,剪取其正常骨髓组织,掺入生理盐水匀浆研磨(在河南省动物实验中心协作下进行),调整细胞个数,210 只小鼠用瘤细胞 5×10^5 /0.2ml 接种于左腋下。接种 7 d 后,尾静脉采血查白细胞总数,挑选接近正常白细胞数的荷瘤小鼠 192 只[体质量(22±2)g,瘤体直径 0.8cm 左右],随机分为荷瘤模型组、荷瘤针刺组、荷瘤艾炙组各 64 只;1 次性腹腔注射环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)(山西普德药业有限公司生产,批号:04120301)150mg/kg^[2]。荷瘤空白组小鼠腹腔注入等量 0.9% 氯化钠溶液(NaCl 250ml/瓶,山东鲁抗辰欣药业有限公司批号:120412107)。依据 CTX 药代动力学过程,停药 4h 后模型成功^[2]。

2.2 取穴及治疗方法 取穴:大椎、膻中、胃俞、足三里。小鼠穴定位参考《中国兽医针灸学》^[3],并模拟大鼠穴定位法,大椎位于背部正中,第 7 颈椎与第 1 胸椎之间;膻中位于第 7 胸椎下两旁,肋间,左右侧各 1 穴;胃俞在第 2 腰椎下两旁,左右侧各 1 穴;足三里位于小鼠后肢膝关节后外侧,腓骨小头下约 5mm 处,左右各 1 穴^[3]。

荷瘤针刺组:按照各组造模时间的先后顺序,在造模完成 4h 后针刺治疗,各组小鼠配对同时进行。用毫针美容毫针(规格:0.19mm×10mm,苏州医疗器械用品有限公司生产),采用管式进针法直刺,进针深度为 3mm,行捻转补法 5 次,留针 6min,每日 1 次,共 6 次。

荷瘤艾炙组:按照各组造模时间的先后顺序,在造模完成 4h 后开始艾炙,各组配对同时进行。用特制美容艾条(规格:0.4cm×25cm,河南南阳飞龙艾绒厂生产)点燃后,在距离穴位皮肤 2cm 处每次固定灸 3min,每日 1 次,共 6 次。

荷瘤空白组、荷瘤模型组:每日隔日抓取、固定,不作任何治疗。

2.3 观测指标及方法

2.3.1 免疫组化法检测 CTX 小鼠骨髓细胞 DNA 修复蛋白 POLB 的表达 从造模成功后第 2 天开始,每天针刺或艾炙后 4h,以颈椎脱臼法处死每组 8 只小鼠取其骨髓,用免疫组化染色法(Ellivison 二步法),测定骨髓细胞中 polB 蛋白的表达量。测定骨髓细胞中 polB 蛋白的表达量。具体方法:取耻骨和股骨骨髓 10% 福尔马林固定,石蜡包埋、切片,烘片;脱蜡至水, PBS 冲洗 3 次;polB 抗原修复,室温下冷却,加过氧化物酶阻断液室温下孵育;再用 PBS 冲洗 3 次后每片加 1 滴非免疫性马血清,室温下孵育;甩去血清,每片加 polB 抗体(一抗),室温下孵育;再以 PBS 冲洗 3 次,甩去 PBS 后每片加 1 滴 HRP 辣根过氧化物酶(二抗),室温下放置 60 min 后 PBS 冲洗;甩去 PBS 每片加 2 滴新鲜

配制的 DAB 液,显微镜下观察 5 min,适时终止反应。自来水冲洗,苏木素复染,酒精脱水干燥。二甲苯透明,中性树脂封固,晾干后观察。分析方法:EnVision 法,每例切片显微镜下 400× 高倍视野计数至少 5 个随机视野,每个视野约 100 个细胞,取阳性细胞数百分比的平均值。polB 主要定位于细胞核和细胞浆内,细胞核着色或细胞核和胞浆同时呈棕黄色或褐色颗粒判为阳性,胞核和胞浆均无着色为阴性。免疫组化染色结果按阳性细胞百分比及染色强度综合记分作半定量分析判定。

2.3.2 Western Blot 法测定 CTX 小鼠骨髓细胞 DNA 修复蛋白 POLB 的含量 从造模成功后第 2 天开始,每天针刺、艾炙 4 h 后,从各组中随机选取 6 只小鼠脱颈处死,取其骨髓,连续 6d。采用 Western blot 法(免疫印迹方法)进行骨髓细胞 DNA 修复蛋白量的检测,包括蛋白质的抽取及定量、样品制备及操作流程如下:①蛋白质抽提:实验对象为细胞样品,取样品 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 细胞, PBS 清洗,去 PBS 加 1ml 含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂(或核蛋白抽提试剂),匀浆后抽提总蛋白。②蛋白质定量:按 KCTMBCA 蛋白质定量试剂盒操作说明操作,测定样品浓度。凝胶为 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 90min;半干转膜,90min,电转液为 1L 溶液含 3.0g Tris,14.4g 甘氨酸,200ml 甲醇;含 5% 脱脂牛奶的 PBST,室温封闭 1h。加一抗,MGMT 稀释液为含 5% 脱脂奶粉的 PBST,稀释 1:1000,4℃,一抗室温孵育 2h;PBST 洗涤 3 次,每次 5min;加二抗,抗鼠 HRP 二抗,稀释液为含 5% 脱脂奶粉的 PBST,稀释 1:5000,室温孵育 2h;PBST 洗涤 3 次,每次 5min;加发光剂,X 光胶片曝光,压片约 3min,显影。

图片保存为电脑文件,并用 Image J 分析软件将图片上每个特异条带灰度值的数字化。将目的蛋白灰度值除以内参 GAPDH 的灰度值,校正误差,所得结果代表某样品的目的蛋白相对含量。

2.3.3 Realtime PCR 法检测 CTX 小鼠骨髓细胞 DNA 修复蛋白 POLB mRNA 的表达 从 CTX 造模后完成后,每天针刺、艾炙后 4 h,以颈椎脱臼法处死各组 6 只小鼠,取一侧的胫骨和股骨骨髓,液氮冷冻,-80℃ 冰箱保存,用 Real-Time PCR 法检测骨髓细胞 DNA 修复基因 POLB mRNA 的表达情况,连续 6d。

2.3.3.1 细胞总 RNA 的抽提 ①将试验标本按序排放在管架,室温解冻;②依次排成相对应的 EP 管;③依次吸取各组细胞悬液 500 μl 加入上列 EP 管中,依次每一管中加入 0.5ml Trizol(预冷),混匀 30s;④各管中加入氯仿 200 μl,剧烈振荡 15s;⑤ 4℃,12000r/min,离心 10min;⑥小心吸出水层加入依次编号的 Eppendorf 管中,再加入二倍体积的异丙醇(约 600 μl),混匀,置于 -20℃ 冰箱 30min;⑦ 4℃,10000r/min,离心 10min,弃上清置沉淀;⑧用 650 μl 75% 乙醇洗涤沉淀,4℃,8000r/min,离心 5min,弃上清置沉淀;⑨重复步骤一遍,充分吸尽残留液;⑩打开管盖,干式恒温器 65℃,5~10min,烘干;⑪ 20 μl DEPC 处理水,溶解 RNA,-20℃ 冰箱,保存,待用。

2.3.3.2 逆转录 cDNA 逆转录反应体系的配置:①将试剂盒从 -80℃ 冰箱取出,复融,将 5× 逆转录 buffer, dNTPs, MMLV, oligo(dT);② 10000 r/min,数秒;③将经过稀释后的 RNA 样本进行 RT,反应体系如下:5× 逆转录 buffer, 4 μl; oligo(dT), 0.5 μl; dNTPs, 0.5 μl;逆转录酶 MMLV, 1 μl;DEPC 处理水, 10 μl;RNA 模板, 4 μl;总体积, 20 μl;④反应条件:37℃, 1h;95℃, 5min。灭活 MMLV。

2.3.3.3 FQ-PCR 反应 PCR 反应体系如下:将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,扩增体系如下:5× PCR buffer, 10 μl;上游引物 F, 0.5 μl;下游引物 R, 0.5 μl; dNTPs, 0.5 μl; TaqMan 荧光探针,

• 2022 •

0.5 μ l; Taq 酶, 1 μ l; dH₂O 水, 32 μ l; cDNA 模板, 5 μ l; 总体积, 50 μ l。

扩增条件: ①50℃, 2min; ②95℃, 5min; ③95℃, 15s; 60℃, 45s; 40Cycle。数据采用仪器自带软件分析: ABI Prism 7300 SDS Software。mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta CT} \times 100\%$, ΔCT = 目标基因 CT 值 - 内参 (GAPDH) CT 值。

引物及探针序列

Custom_Name: POL β

Sequence: Pro 5'-AGT CTG GAA GGC AGA ACC ATG TCC -3'

Modify: 5端 FAM 修饰; 3端 Tama 修饰

Custom_Name: POL β POL β B

Sequence: 5'-CIT TGA GAA GAA CGT GAG CC -3'

5'-CTC GTA TCA TCC TGC CGA AT -3'

2.4 统计分析 数据分析采用 SPSS13.0 统计分析软件。计量资料数据以均数, $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计采用单因素方差分析, 按 $\alpha = 0.05$ 标准进行检验, 用 Levene 法进行方差齐性检验, 若方差齐, 两两比较采用 LSD 法; 若方差不齐, 两两比较采用 Tamhane 法。

3 结果

3.1 针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复蛋白 pol β 表达的影响 见表 1。

表 1 针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复蛋白 POL β 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
荷瘤空白组	8.00 $\pm$ 2.070	7.63 $\pm$ 1.302	8.00 $\pm$ 1.009	9.75 $\pm$ 2.712	30.00 $\pm$ 1.773
荷瘤模型组	11.88 $\pm$ 8.526 ¹⁾	20.75 $\pm$ 10.011	15.00 $\pm$ 3.381 ¹⁾	12.00 $\pm$ 2.000	30.75 $\pm$ 3.059
荷瘤针刺组	16.13 $\pm$ 5.915 ¹⁾	25.13 $\pm$ 7.559 ¹²⁾	15.75 $\pm$ 2.188	13.88 $\pm$ 1.356 ¹⁾	13.88 $\pm$ 2.949 ¹²⁾
荷瘤艾灸组	16.75 $\pm$ 5.148 ¹⁾	26.38 $\pm$ 3.503 ¹²⁾	16.25 $\pm$ 2.326	14.00 $\pm$ 2.507 ¹⁾	12.63 $\pm$ 2.446

与荷瘤空白组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与荷瘤模型组比较, ¹²⁾ $P < 0.05$; $n = 6$

表 1 结果显示, 与荷瘤空白组比, 荷瘤模型组、荷瘤针刺组和荷瘤艾灸组骨髓细胞 POL β 蛋白表达第 2 天大幅升高, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明环磷酰胺造成荷瘤小鼠骨髓 DNA 损伤, 为了保护机体造血细胞, 触发切除修复机制迅速启动。从第 3 天开始逐渐降低, 且第 2~6 天, 荷瘤针刺组、荷瘤艾灸组始终高于荷瘤模型组, 尤其在第 3 天, 荷瘤针刺组、荷瘤艾灸组高于荷瘤模型

组有显著性差异 ($P < 0.05$), 且从第 4 天开始比荷瘤模型组恢复幅度较慢, 说明针灸可以明显提高荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 损伤修复能力, 对抗化疗所致的细胞损伤, 减轻 CTX 化疗所致骨髓抑制。

3.2 针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复蛋白 pol β 蛋白量的影响 见表 2。

表 2 针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复蛋白 POL β 蛋白量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
荷瘤空白组	0.76 $\pm$ 0.283	0.67 $\pm$ 0.295	0.35 $\pm$ 0.093	1.08 $\pm$ 0.299
荷瘤模型组	1.01 $\pm$ 0.450	0.34 $\pm$ 0.204	0.46 $\pm$ 0.240	0.47 $\pm$ 0.115 ¹⁾
荷瘤针刺组	1.56 $\pm$ 0.577	0.99 $\pm$ 0.329 ¹⁾	0.79 $\pm$ 0.761	0.91 $\pm$ 0.135
荷瘤艾灸组	0.84 $\pm$ 0.644	0.47 $\pm$ 0.739 ¹⁾	0.83 $\pm$ 0.526	0.96 $\pm$ 0.242

与荷瘤空白组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与荷瘤模型组比较, ¹²⁾ $P < 0.05$; 与荷瘤针刺组比较, ¹³⁾ $P < 0.05$; $n = 6$

表 2 结果显示, 荷瘤小鼠注射 CTX 后, 与荷瘤空白组比, 荷瘤模型组、荷瘤针刺组、荷瘤艾灸组 DNA 切除修复蛋白 pol β 蛋白量较高, 说明环磷酰胺损伤骨髓细胞后, 荷瘤小鼠机体修复机制启动, 修复蛋白 pol β 高表达。第 2~6 天, 与荷瘤模型组比, 荷瘤针刺组 pol β 蛋白量均较高, 且第 3 天有显著性差异 ($P < 0.05$);

第 3~6 天, 与荷瘤模型组比, 荷瘤艾灸组均高于荷瘤模型组但无统计学差异。荷瘤针刺组第 3 天优于荷瘤艾灸组, 有显著差异 ($P < 0.05$)。

3.3 针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复蛋白 pol β mRNA 表达的影响 见表 3。

表 3 针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复蛋白 POL β mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
荷瘤空白组	1.64 $\pm$ 0.779	3.54 $\pm$ 0.777	2.11 $\pm$ 1.313	3.51 $\pm$ 4.576	1.77 $\pm$ 1.119
荷瘤模型组	3.04 $\pm$ 0.795 ¹⁾	5.98 $\pm$ 2.755	3.32 $\pm$ 3.810	3.63 $\pm$ 3.133	2.99 $\pm$ 2.408
荷瘤针刺组	5.54 $\pm$ 1.334 ¹²⁾	7.41 $\pm$ 2.805 ¹⁾	4.43 $\pm$ 2.981	1.33 $\pm$ 1.599	1.89 $\pm$ 1.887
荷瘤艾灸组	4.95 $\pm$ 1.527 ¹²⁾	6.61 $\pm$ 2.659 ¹⁾	1.08 $\pm$ 0.588	0.88 $\pm$ 0.283	1.74 $\pm$ 2.234

与荷瘤空白组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与荷瘤模型组比较, ¹²⁾ $P < 0.05$; $n = 6$

表 3 结果显示, 荷瘤小鼠注射 CTX 后, pol β mRNA 高表达。荷瘤模型组从第 2 天开始, pol β mRNA 始终高于同一时段的荷瘤空白组, 在第 3 天达到高峰, 然后逐渐回落, 提示荷瘤模型组小鼠的碱基切除修复机制在前 3 天作用明显。与荷瘤空白组、荷瘤模型组相比, 在第 2~3 天, 针刺组 POL β 的基因表达增高, 其中第 2 天有统计学差异 ($P < 0.05$)。与荷瘤空白组、荷瘤模型组相比, 艾灸组 POL β 的基因表达第 2~3 天增高, 其中第 2 天有统计学差异 ($P < 0.05$)。至第 5 天, 荷瘤针刺组、荷瘤艾灸组的 pol β mRNA 水平逐渐降低, 接近荷瘤空白组水平, 组间比较无统计学差异。说明针刺和艾灸可以上调化疗荷瘤小鼠骨髓细胞 pol β mRNA

水平, 加速骨髓细胞修复进程, 而荷瘤模型组的 pol β mRNA 水平第 3 天达最高值后, 降低缓慢, 说明其修复速度较慢。从总体看, 针刺调节 POL β 基因表达的效应, 优于艾灸, 但样本量较小, 仍需要进一步观察。

4 讨论

近年来, 恶性肿瘤的发病率逐年升高, 成为威胁人类身体健康的常见疾病^[16]。化疗是恶性肿瘤最主要的治疗手段之一, 而骨髓抑制是化疗最常见的毒副反应之一, 以外周白细胞减少, 伴神疲倦怠, 乏力懒言, 腰酸腿软, 纳呆汗多, 心烦燥热等为主要临床表现, 严重者可能合并感染, 高热并危及生命^[17]。此病归属祖国

医学“虚证”范畴。祖国医学认为“肾为先天之本”，主骨生髓，受五脏六腑之精而藏之，“脾为后天之本”，气血生化之源，五脏六腑赖以滋养，二者互为资生，相辅为用，故当从脾肾论治。导师路政教授经过近三十年大量的临床观察及规范化的动物实验研究筛选出大椎、肾俞（双）、脾俞（双）、足三里（双）穴位，并依据“虚者补之”“实者温之”原则进行治疗。

大多数化疗药物抗肿瘤的主要机制是引起骨髓细胞 DNA 损伤，进而导致肿瘤细胞凋亡^[12]，DNA 修复功能异常，导致骨髓抑制等一系列不良反应。目前，已知有 4 种主要的 DNA 修复途径：碱基切除修复（base excision repair, BER），核苷酸切除修复（nucleotide excision repair, NER），错配修复（mismatch repair, MMR）和双链断裂修复（double-strand break repair, DSBR）^[13,14]。其中，BER 是主要的 DNA 修复机制之一，BER 是烷化剂及氧化物损伤的主要修复途径，DNA 聚合酶 β （pol β ）为 DNA 聚合酶家族的一员，在碱基切除修复、DNA 复制及损伤合成中发挥重要作用^[15]，POL β 相对特异性地参与 BER 反应，填补单核苷酸缺口，修复损伤的 DNA^[16]，参与单链断裂修复和增强 DNA 对烷化剂的抵抗力，在减轻烷化剂导致的损伤中起主导作用^[17]。DNA 聚合酶 β （pol β ）是参与细胞修复的主要聚合酶之一，前期我们研究发现烷化剂 CTX 可以使骨髓细胞周期受阻，DNA 含量减少，骨髓抑制，外周血白细胞下降，针刺和艾灸能明显上调 CTX 正常小鼠骨髓细胞 DNA 修复蛋白 pol β 的表达，加速细胞周期进程，有利于 DNA 的合成和修复，保护骨髓细胞^[18,19]，减轻骨髓抑制。本研究选荷瘤小鼠为研究对象，目的是为了更贴近临床，为临床治疗提供可靠的实验依据。通过免疫组化法定性（半定量），Western Blot 法定量，Realtime PCR 法测定其 pol β mRNA 转录，同时针刺通过上调化疗机体骨髓细胞中的 DNA 聚合酶 β （pol β ）蛋白表达及 RNA 转录，经碱基切除修复机制，减轻化疗药物所致骨髓损伤，改善骨髓抑制，DNA 损伤作为一种刺激信号，激活 DNA 修复系统基因以修复其损伤，pol β 表达增高引起基因断裂损伤，细胞为维持自身的平衡状态，经信号转导途径使 pol β 的启动子激活，进而通过 pol β 的高表达来修复 DNA 的损伤^[18]。DNA 损伤修复是一个多因素共同参与、多步骤的复杂过程，针对不同形式的损伤修复方式也不尽相同，且 BER 主要成员之间存在着广泛的相互影响，有待于我们进一步深入研究。

参考文献：

- [1] 徐红达, 贾英杰, 陈 军, 等. 艾灸治疗化疗所致骨髓抑制的现状及相关分析 [J]. 肿瘤, 2014, 34 (6): 564.
- [2] Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation [J]. Curr Opin Hematol, 2000, 7 (6):

- 358.
- [3] 张 莉, 许 峰. 复制型二磷酸核苷聚合酶抑制剂在 DNA 修复途径与抗肿瘤中的作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2014, 33 (12): 859.
- [4] 赵应楠, 魏俊杰, 赵 源. DNA 损伤修复调控因子与肿瘤耐药的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21 (11): 2608.
- [5] 路 政, 于冬冬, 曹大明, 等. 针灸对环磷酰胺小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复蛋白 DNA 聚合酶 β 的调节作用 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30 (2): 527.
- [6] 闫社海. 针灸对荷瘤小鼠环磷酰胺化疗后白细胞及骨髓有核细胞总数的影响 [J]. 河南中医, 1997, 17 (3): 154.
- [7] 中山医学院. 药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 221.
- [8] 于 彪. 中国兽医针灸学 [M]. 北京: 农业出版社出版, 1984: 209.
- [9] 毕列加, 李群. 大鼠穴位图谱的编制 [J]. 实验动物与动物实验, 1991, 3 (1): 2.
- [10] 杨 峰, 王 峰, 魏 石, 等. 中药健脾益肾方防治恶性肿瘤化疗后白细胞减少的临床研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20 (3): 357.
- [11] 杨玉琴. G-CSF 联合黄精汤治疗乳腺癌化疗所致白细胞减少的疗效观察 [J]. 南通大学学报 (医学版), 2012, 32 (6): 526.
- [12] 张世彬, 王宇亮, 周向东. 碱基切除修复与抗肿瘤药物耐药 [J]. 肿瘤, 2013, 33 (03): 294.
- [13] Graf N, Ang W H, Zhu G, et al. Role of endonucleases XPF and XPG in nucleotide excision repair of platinumed DNA and cisplatin/cisplatin cytotoxicity [J]. ChemBiochem, 2011, 12 (7): 1376.
- [14] Chirumam D, Taniguchi T, De La Vega M, et al. Chemosensitization to cisplatin by inhibition of the Fanconi anemia/BRCA pathway [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5 (4): 952.
- [15] Schumacher-Reis BL, Nardelli S, Régis-Silva CG, et al. DNA polymerase beta from Trypanosoma cruzi is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions [J]. Mol Biochem Parasitol, 2012, 183 (2): 122.
- [16] Nowak R, Woszczyński M, Siedlerki J A. Changes in the DNA polymerase beta gene expression during development of lung, brain, and testis suggest an involvement of the enzyme in DNA recombination [J]. Exp Cell Res, 1990, 191 (1): 51.
- [17] Tans K, Nakamura J, Asagoshi K, et al. Interplay between DNA polymerases beta and lambda in repair of oxidation DNA damage in chicken DT 40 cells [J]. DNA Repair (Amst), 2007, 6 (6): 869.
- [18] 路 政, 曹大明, 李亚明, 等. 针灸对 CTX 小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复相关蛋白的调节 [J]. 中国针灸, 2009, 29 (10): 821.
- [19] 马艳英, 张德伟, 王 峰, 等. 五福交健散对 NIH/3T3 细胞的基因损伤及 DNA 聚合酶 β 表达的影响 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31 (10): 1574.