

- [32] Tuncer Turkan ,Kaya Arzu ,Gulkesen Arif ,et al. Matrix metalloproteinase - 3 levels in relation to disease activity and radiological progression in rheumatoid arthritis[J]. Adv Clin Exp Med Off Org Wroc Med Univ , 2019 28(5) : 665.
- [33] Nao Tokai ,Shuzo Yoshida ,Takuya Kotani ,et al. Correction: Serum matrix metalloproteinase 3 levels are associated with an effect of iguratimod as add - on therapy to biological DMARDs in patients with rheumatoid arthritis[J]. PLoS ONE 2019 ,14( 1) : e0211750.
- [34] 刘琦,周星,周联,等. NLRP3 炎症小体在慢性疾病中的研究进展[J]. 转化医学电子杂志 2017 4(3) : 66.
- [35] 赵紫琴,徐瑾,王瑞琳,等. 类风湿性关节炎滑膜组织中 NLRP3 炎症小体及下游因子 IL - 1 $\beta$ /IL - 18 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志 2019 35(5) : 534.
- [36] 聂舒,王宏伟. 光动力疗法诱导肿瘤相关成纤维细胞 NLRP3 炎症小体活化促进 IL1 $\beta$  生成治疗皮肤鳞癌[J]. 中国激光医学杂志 , 2018 27(2) : 71.
- [37] 崔冠军. 乳铁蛋白对 IL - 1 $\beta$  诱导人骨关节炎滑膜成纤维细胞 MMPs、COX - 2、PGE2 产生的影响[D]. 安徽医科大学硕士学位论文 2019.
- [38] Zhao Chunmei ,Gu Yibin ,Zeng Xiaoyun ,et al. NLRP3 inflammasome regulates Th17 differentiation in rheumatoid arthritis[J]. Clin Immunol ( Orlando , Fla. ) 2018 ,197: 154.
- [39] Pang Zhiqiang ,Wang Guoqiang ,Ran Nan ,et al. Inhibitory Effect of Methotrexate on Rheumatoid Arthritis Inflammation and Comprehensive Metabolomics Analysis Using Ultra - Performance Liquid Chromatography - Quadrupole Time of Flight - Mass Spectrometry ( UPLC - Q/TOF - MS ) [J]. Internat J Mol Sci 2018 ,19( 10) : 2894.

## 针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞中 Notch 信号通路的影响

于冬冬<sup>1,3</sup>, 路玫<sup>1\*</sup>, 滕迎春<sup>2</sup>, 关伟强<sup>3</sup>, 刘玉璐<sup>2</sup>, 马田田<sup>1</sup>, 庄语<sup>1</sup>, 王永欣<sup>1</sup>

( 1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450008; 3. 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450008)

**摘要:**目的 以 Notch 信号通路为切入点, 通过观察针刺、艾灸对荷瘤小鼠骨髓抑制的影响, 阐释 Notch 信号通路上差异基因与针灸改善荷瘤小鼠化疗所致骨髓抑制的信号途径及作用机制。方法 选取雄性 KM 小鼠 40 只, 自由喂养 3 天后进行植瘤, 1 周后, 挑选荷瘤小鼠白细胞接近正常范围, 瘤体大小均匀, 长势良好的 32 只小鼠随机分为 4 组, 相同剂量 0.9% NaCl 依次腹腔注射荷瘤空白组小鼠, 其余 3 组小鼠 1 次性腹腔注射 CTX 150mg/kg, 停药后 4h 模型即成。荷瘤空白组小鼠每日依次固定不给予治疗措施, 其余 3 组选取“大椎”“膈俞”“肾俞”“足三里”依次施针和施灸, 每日 1 次, 连续 5 天。第 6 天在无菌操作台上取股骨和胫骨, 运用免疫组化法、Western Blot 法、Real - time PCR 法检测各组荷瘤小鼠骨髓细胞 Notch 信号通路上差异蛋白 numb。结果 荷瘤小鼠施以针刺和艾灸干预后, 与荷瘤模型组比, 治疗组各小鼠骨髓细胞 Notch 信号通路上 numb 蛋白的表达含量均有所提升。结论 针灸通过调节因 CTX 化疗所致过度激活的 Notch 信号通路上的 numb 基因, 以平衡 Notch 信号通路的过度激活, 改善骨髓造血功能, 减轻骨髓抑制。

**关键词:** 针灸; 荷瘤小鼠; Notch; numb; 骨髓抑制

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.10.079

中图分类号: R245 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2020)10-2556-03

### Acupuncture and moxibustion on CTX tumor - burdened the effect of Notch signaling pathway in the bone marrow cells in mice

YU Dong-dong<sup>1,3</sup>, LU Mei<sup>1\*</sup>, TENG Ying-chun<sup>2</sup>, GUAN Wei-qiang<sup>3</sup>, LIU Yu-lu<sup>2</sup>, MA Tian-tian<sup>1</sup>, ZHUANG Yu<sup>1</sup>, WANG Yong-xin<sup>1</sup>

( 1. Henan University of Chinese Medicine Zhengzhou , Henan 450046 , China; 2. First Affiliated Hospital Henan University of Chinese Medicine Zhengzhou , Henan 450008 , China; 3. Third Affiliated Hospital Henan University of Chinese Medicine Zhengzhou Henan 450008 , China)

**Abstract: Objective** Notch signaling pathway as the breakthrough point , through the observation of acupuncture and moxibustion for a tumor - burdened bone marrow suppression in mice , the influence of genes and explained the Notch signal pathway differences of acupuncture and moxibustion improve tumor - burdened bone marrow suppression caused by chemotherapy in mice signaling pathway and action mechanism. **Methods** 40 male KM mice , free feeding plant tumor after 3 days , a week later , the white blood cells close to the normal range , choose a tumor - burdened mice tumors are uniform and grew well 32 mice were randomly divided into four groups , the same dose of 0.9% Nacl , in turn , intraperitoneal injection of mice a tumor - burdened blank , the rest of the three groups of mice by intraperitoneal injection of one sex CTX 150 mg/kg , 4 h later , drug withdrawal model. A

收稿日期: 2019-12-20; 修订日期: 2020-07-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81072884); 国家自然科学基金青年基金(81804196); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划(2019GGJS108)  
作者简介: 于冬冬(1983-), 男(汉族), 河南项城人, 河南中医药大学副教授, 硕士研究生导师, 博士学位, 主要从事针灸抗放化疗消化系统毒副作用及脏器损伤的研究工作。

\* 通讯作者简介: 路玫(1958-), 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。

tumor - burdened blank group mice were fixed in order not to give daily treatment , the remaining three groups " Da zhui" , " Ge shu" , " Shen shu" , " Zu sanli" , needle and moxibustion , once a day , five days in a row. 6 days on the stage in the femur and tibia in an aseptic operation , using immunohistochemical method and Western Blot method , the Real - time PCR method to detect each group a tumor - burdened bone marrow cells in mice Notch signaling pathway on differences in protein numb.

**Results** The tumor - burdened mice with acupuncture and moxibustion after the intervention , and than a tumor - burdened model group , treatment group the mice bone marrow cells , Notch signaling pathway on numb protein expression levels were increased.

**Conclusion** Acupuncture by adjusting the chemotherapy with CTX caused by excessive activation of Notch signaling pathway numb on genes , and to balance the excessive activation of Notch signaling pathways , improve bone marrow hematopoietic function , reduce the bone marrow suppression.

**Key words:** Acupuncture and Moxibustion; Tumor - burdened mice; Notch; Numb; Bone marrow inhibition

治疗恶性肿瘤化疗仍是其必要手段 , 由于化疗药物的药毒性 , 以白细胞减少为主的骨髓抑制表现是最致命的毒副作用。Notch 信号通路对造血系统中的造血细胞增殖、分化过程中至关重要 , 且有研究发现 Notch 信号通路是控制造血干/祖细胞命运分化的关键作用途径<sup>[1-2]</sup>。课题组前期研究结果已阐明针灸可以拮抗化疗所致骨髓抑制、肝损伤等一系列毒副作用<sup>[3-4]</sup>。鉴于前期研成果 , 本课题运用 CTX 造成荷瘤小鼠骨髓抑制模型 , 经针刺和艾灸治疗后 , 运用免疫组化法、Realtime - PCR 法、Western Blot 法检测 Notch 信号通路上 numb1、numb2 蛋白表达水平及 mRNA 转录情况 , 从不同层次验证 Numb/Notch 信号途径是针灸减轻 CTX 荷瘤小鼠骨髓抑制的重要通路 , 选用荷瘤小鼠为研究对象 , 可为临床研究提供更为合理的实验室依据。

## 1 材料和方法

**1.1 实验方案** 清洁级雄性昆明种 (KM) 小鼠 [由郑州大学医学院提供 scxk(豫)2010-0002] 40 只 , 体质量 (18 ± 2) g , 按体重随机分为荷瘤空白、荷瘤模型、荷瘤针刺、荷瘤艾灸 4 组 , 每组 8 只。购买后适应实验室自由饲养 3 天 , 后在无菌操作台上植瘤。

**1.2 实验材料** 特制实验用艾条 (规格 0.4cm × 25cm , 湖北李时珍艾集团)、毫针 (规格 0.18mm × 13mm , 苏州佳健医疗器械用品有限公司)、自制小鼠架、注射器、棉签等; 造模用环磷酰胺、PBS 液、DAB 液、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 Marker; 蛋白定量试剂盒; 电泳缓冲液及丙烯酰胺 (29:1)。低温冰箱 , 离心机 , Real-time 检测仪 , 电热干燥箱、电泳仪型号: mini protean 3 cell , 发光剂 ECLTM western blotting detection 等所需实验室仪器。

**1.3 模型制作方法** 挑选遗传 3 代 , 且腹水生长良好的 S180 瘤源小鼠 , 对小鼠腹部消毒 , 抽取腹水 2.3ml , 注入到已备好的 13.8ml 的生理盐水的三角烧瓶内 , 混合均匀配成 7 倍稀释液。40 只小鼠 0.2ml/只接种于左腋下。接种一周后 , 镜检小鼠外周血白细胞 , 挑选白细胞计数正常 , 瘤体生长均匀的荷瘤小鼠 32 只 , 随机分为 4 组 8 只/组。腹腔注射 150mg/kg CTX 溶液 1 次即可 (山西普德药业有限公司生产 , 批号: 04120501)<sup>[4]</sup>。荷瘤空白组注射等 0.9% NaCl 液 (250ml/瓶 , 山东鲁抗辰欣药业有限公司批号: 120412107)。4 h 后模型即成<sup>[5]</sup>。

**1.4 取穴及治疗方法** 取穴: 大椎、膈俞、肾俞、足三里。参考

《中国兽医针灸学》<sup>[6]</sup> , 大椎: 位于小鼠背部正中 , 第七颈椎与第一胸椎之间; 膈俞: 位于小鼠第七胸椎下 , 两旁肋间 , 左右各 1 穴; 肾俞: 位于小鼠第二腰椎两旁 , 左右各 1 穴; 足三里 (后三里): 位于小鼠后肢膝关节后外侧 , 腓骨小头下 5mm 处 , 左右各 1 穴<sup>[7]</sup>。

荷瘤针刺组 (C): 小鼠选用上述腧穴依次施以针刺治疗 , 进针 3mm , 留针 6min , 每日 1 次 , 共 5 次。

荷瘤艾灸组 (D): 小鼠选用上述腧穴依次施以特制艾条悬灸治疗 , 距离穴位皮肤 2cm , 每穴悬灸 3min , 2 穴为 1 组 , 共悬灸 6min , 每日 1 次 , 共 5 次。

荷瘤空白 A 组 , 荷瘤模型 B 组: 每日陪同抓取、固定 , 不做任何治疗。

## 1.5 观测指标及方法

**1.5.1 免疫组化法检测各组小鼠骨髓细胞 numb 蛋白的表达情况** 第 6 天 , 以颈椎脱臼法处死 , 无菌操作台干冰上迅速取其股骨和胫骨 , 按照免疫组化操作步骤进行检测。OD 值同时使用软件计算。

**1.5.2 Western Blot 法测定 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 numb 蛋白的含量** 取材方法同上。按照 Western blot 法 (免疫印迹法) 步骤进行骨髓细胞 numb 蛋白量的检测。

**1.5.3 Realtime PCR 法检测 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 numb mRNA 的转录** 取材同上。用 Real-time PCR 法检测骨髓细胞 numb mRNA 转录情况。①细胞总 RNA 的抽提。②逆转录 cDNA ③FQ - PCR 反应引物及探针序列 Custom\_Name: numb1 numb2Sequence Pro 5' - AGT CTG GAA GCC AGA ACC ATG TCC - 3' Modify: 5 端 FAM 修饰; 3 端 Tamra 修饰 Custom\_Name: numb1 numb2 F numb1 numb2 RSequence: 5' - CTT TGA GAA GAA CGT GAG CC - 3' 5' - CTC GTA TCA TCC TGC CGA AT - 3'

**1.5.4 统计分析** 收集实验数据 , 建立数据库 , 分析采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示 , 采用单因素方差分析进行数据统计 , 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 , 采用 LSD 法; 若不齐 , 比较采用 Tamhane 法。

## 2 结果

见表 1。

表 1 针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞中 Notch 通路上 numb 蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	免疫组化 (n = 8)		Realtime - PCR (n = 8)		Western - Blot (n = 6)	
	numb1	numb2	numb1	numb2	numb1	numb2
荷瘤空白组	810.75 ± 53.441	820.00 ± 28.471	0.298 ± 0.148	5.246 ± 2.058	3288.8 ± 1329.45	3968.5 ± 1023.66
荷瘤模型组	741.63 ± 22.226 <sup>1)</sup>	730.63 ± 17.533 <sup>1)</sup>	0.209 ± 0.125	3.073 ± 1.172 <sup>1)</sup>	2562.4 ± 778.46	2978.5 ± 932.56
荷瘤针刺组	785.88 ± 43.099 <sup>1)2)</sup>	765.88 ± 25.085 <sup>1)2)</sup>	0.171 ± 0.160	3.301 ± 1.0691)	3253.4 ± 794.40	3629.0 ± 1676.14
荷瘤艾灸组	790.25 ± 28.283 <sup>1)2)</sup>	761.63 ± 41.376 <sup>1)2)</sup>	0.303 ± 0.183	5.048 ± 1.583 <sup>1)2)</sup>	2805.3 ± 515.03	3340.1 ± 781.82

与 A 组比较 ,<sup>1)</sup> P < 0.05 , 与 B 组比较 ,<sup>2)</sup> P < 0.05

由表 1 可见,CTX 化疗后各组荷瘤小鼠骨髓细胞中 Notch 信号通路上 numb1、numb2 蛋白表达含量明显降低,说明化疗药物 CTX 导致 Numb/Notch 信号通路失其平衡,引发骨髓抑制,治疗组荷瘤小鼠施以 5 天针刺、艾灸干预后,从免疫组化检测层面结果可示:与 A 组比,其余 3 组荷瘤小鼠骨髓细胞中的 numb 蛋白表达量差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 B 组比,C 组、D 组 numb 蛋白表达量均升高,但差异无统计学意义;与 B 组比,D 组 numb 2 含量仅 RT-PCR 结果显示升高,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。总体来讲,针刺、艾灸干预后,numb 蛋白含量有升高的趋势,从蛋白表达、基因转录、蛋白质印迹三方面结果较为吻合,且变化趋势较明显,说明 Numb/Notch 信号通路是针灸改善化疗所致骨髓抑制,升高白细胞的关键信号通路。

### 3 讨论

恶性肿瘤是严重威胁人类健康和社会发展的疾病<sup>[8]</sup>,化疗是目前临床治疗肿瘤的最主要手段<sup>[9]</sup>,但易产生骨髓抑制,外周白细胞减少等毒副作用<sup>[10]</sup>。中医无骨髓抑制(白细胞减少症)的病名,但根据其羸瘦食少、倦怠乏力、恶心呕吐、舌淡苔薄白、脉细弱等一系列临床症状,多纳属“虚劳”“血虚”等,主要由于化疗药毒导致脾肾亏虚引起。课题组前期经过 30 多年大量临床病例观察以及动物实验多方面、多层次研究,以补脾固肾、疏肝调血为其治则,以“大椎”“膈俞”(双)、“肾俞”(双)、“足三里”(双)为针灸拮抗骨髓抑制的有效穴组。此达补气调血,温阳脾肾之功,改善骨髓抑制,提升骨髓造血功能。

Notch 信号通路是通过维持造血干细胞的增殖及分化潜能,在造血过程中发挥着十分重要的调节作用,进而改善骨髓造血功能,且发现其实现下调必须依赖 Numb 通过  $\alpha$ -衔接蛋白的介导<sup>[11,12]</sup>。Numb 因子是 Notch 信号通路上的上游分子,重要下调因子和负性调节因子,通过不对称有丝分裂拮抗 Notch 家族的细胞膜受体来控制细胞的命运,因此,关系到 Notch 信号通路调控作用决定性基因是 Numb<sup>[13,14]</sup>。Numb 因子通过拮抗 Notch 信号分子及其配体发挥抑制肿瘤的作用,控制肿瘤的发生及进展<sup>[15]</sup>。Verdi 等<sup>[16]</sup>在小鼠身上也发现了 Numb 的亚型,其中 Numb-1、3 作用是促进细胞增殖,Numb-2、4 则是促进细胞分化<sup>[17]</sup>。且有研究发现 Notch 和 Numb 在生物学上相互拮抗的作用在发育和内环境稳定过程中起着重要作用<sup>[18]</sup>。因此,Numb1 与 Numb2 具有促进细胞增殖和分化的作用。且前期研究证实 Numb 的表达降低可使 Notch 信号通路激活,表达增强<sup>[19]</sup>,可见只有 Notch 信号通路上差异蛋白之间的正常表达及相互作用才能够共同维持骨髓正常的造血功能。

通过本研究从免疫组化,RT-PCR,WB 三个不同层次结果可示,各组荷瘤小鼠注射 CTX 后,由于化疗药物环磷酰胺药毒性甚大,起到化疗作用的同时亦对机体造成巨大伤害,且最易损伤骨髓造血系统,近而使骨髓细胞中 Notch 信号通路上游分子 numb 蛋白(numb1、numb2)表达量降低,致使 Numb/Notch 信号通路失去平衡,造成其过度激活,引发骨髓抑制,肝损伤,免疫力低下等一系列多系统毒副作用。针灸治疗 5 次后,治疗组小鼠骨髓细胞中 Notch 信号通路上 numb 蛋白升高,针灸通过调控 Numb 蛋白抑制了过度激活的 Notch 信号通路,使 Numb/Notch 信号通路归于平衡,改善骨髓造血功能,减轻骨髓抑制。由于本研究是国家自然科学基金课题一部分,通过前期实验已经筛选出 7 个显著性差异基因<sup>[20]</sup>,本研究运用免疫组化法、Realtime-PCR 法、Western Blot 法检测小鼠骨髓造血细胞 Notch 信号通路 numb1/2 蛋白

表达变化,从蛋白表达、基因转录以及蛋白质印记不同层面阐释针灸改善 CTX 化疗所致骨髓抑制的微观机制和信号途径。初步阐明 Numb/Notch 信号通路应该是针灸拮抗化疗导致骨髓抑制的关键途径之一。本研究发现有关骨髓抑制的 Notch 通路上差异基因较多,并发现 MARK 等信号通路亦参与作用,Notch 通路不但参与骨髓造血系统,亦参与肝损伤等消化系统,但其相互作用机制以及参与其他系统的机制有待于进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] Fiuza UM, Arias AM. Cell and molecular biology of Notch [J]. J Endocrinol 2007, 194(3): 459.
- [2] Jauffred B, Llense F, Sommer B, et al. Regulation of centrosome movements by numb and the collapsin response mediator protein during Drosophila sensory progenitor asymmetric division [J]. Development, 2013, 140(13): 2657.
- [3] 路玫,曹大明,赵喜新,等. 针灸对环磷酰胺所致骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期调节蛋白 Cyclin D1 表达及细胞周期的动态影响 [J]. 中国中西医结合杂志 2011, 31(2): 238.
- [4] 于冬冬. 针灸对 CTX 化疗荷瘤小鼠骨髓细胞中 Notch 信号通路相关差异基因调控的研究 [D]. 湖北中医药大学博士学位论文 2015.
- [5] 中山医学院等编著. 药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 221.
- [6] 于船. 中国兽医针灸学 [M]. 北京: 农业出版社, 1984: 209.
- [7] 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等. 大鼠穴位图谱的研制 [J]. 实验动物与动物实验, 1991, 3(1): 2.
- [8] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤 2017, 26(1): 1.
- [9] 张淑香,黎贵,徐波. 基于循证实践的化疗静脉给药的评估 [J]. 护理管理杂志 2013, 5(5): 322.
- [10] 于冬冬,路玫,王延超,等. 针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 切除修复蛋白 POL $\beta$  的影响 [J]. 时珍国医国药 2016, 27(8): 2021.
- [11] Chiamonte R, Basile A, Tassi E, et al. A wide role for Notch-1 signaling in acute leukemia [J]. Cancer Lett 2005, 219: 113.
- [12] Berdnik D, Torok T, González-Gaitán M, et al. The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila [J]. Dev Cell 2002, 3(2): 221.
- [13] 谢承志. Numb 的研究现状及展望 [J]. 中国普通外科志 2009, 18(9): 967.
- [14] 韩帮锋. Numb 蛋白抑制肿瘤发生的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志 2011, 38(1): 67.
- [15] 王超,张楚瑶,冯炜炜. Numb 在肿瘤中的作用 [J]. 国际肿瘤学杂志 2012, 39(7): 541.
- [16] Verdi JM, Bashirullah A, Goldhawk DE, et al. Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. Proliferation in the neuronal lineage [J]. Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96(18): 10472.
- [17] Dho SE, French MB, Woods SA, et al. Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain [J]. J Biol Chem 1999, 274(46): 33097.
- [18] 曲军,张辉,叶颖,等. 细胞分化决定蛋白 Numb/Notch 1 拮抗性表达与结直肠癌病理特征及预后的关系 [J]. 中华实验外科杂志 2012, 29(2): 178.
- [19] 路玫,刘玉璐,曹大明,等. 针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞中 Notch 信号通路相关差异基因蛋白表达量的影响 [J]. 时珍国医国药 2018, 29(7): 1764.
- [20] 滕迎春. 针灸对健康小鼠环磷酰胺所致骨髓抑制 Notch 信号通路影响的研究 [D]. 湖北中医药大学博士学位论文 2015.