

回阳固本汤促进异基因造血干细胞移植后自然杀伤细胞重建的机制研究[△]

高小丽*, 何海涛, 王 启, 姚翔媚, 秦 涛, 张海溪, 赵 婕, 冯 帅, 胡 芑, 杨同华[#](云南省第一人民医院血液科, 云南省血液系统疾病临床医学研究中心, 昆明 650032)



中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2023)09-1046-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2023.09.003

摘 要 目的:探讨回阳固本汤对异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后自然杀伤细胞(NK细胞)重建与NK细胞活性的影响及其分子调控机制。方法:(1)临床研究。选取2021年7月至2022年9月于该院行allo-HSCT的患者40例,根据治疗方式分为对照组($n=20$)与HYGB组($n=20$)。对照组患者仅采用allo-HSCT单独治疗,HYGB组患者于allo-HSCT前采用回阳固本汤干预4周。allo-HSCT治疗后对两组患者进行疗效评估,检测两组患者外周血NK细胞计数、外周血NK细胞标志分子CD56与CD16的表达,分离两组患者外周血NK细胞,体外培养测定细胞活性,检测磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路蛋白表达情况。(2)体外细胞实验。从健康体检者外周血中分离培养NK细胞,分为对照组(阴性对照)、HYGB组(回阳固本汤干预)与LY294002组(回阳固本汤+PI3K抑制剂LY294002干预),测定三组细胞活性与凋亡情况。结果:(1)对照组患者造血重建良好率为90%(18/20),复发率为10%(2/20),非移植相关死亡率为5%(1/20);HYGB组患者造血重建良好率为100%(20/20),复发率为5%(1/20),未出现死亡,两组患者疗效比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。但HYGB组患者急性移植物抗宿主病(aGVHD)发生率(10%,2/20)显著低于对照组(45%,9/20),外周血NK细胞比例及CD56、CD16表达量显著高于对照组,NK细胞体外增殖活性高于对照组,凋亡率低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,HYGB组患者NK细胞内PI3K/Akt通路显著激活,差异有统计学意义($P<0.05$)。(2)与HYGB组相比,LY294002组NK细胞增殖活性降低,凋亡率升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),LY294002逆转了回阳固本汤在体外促进NK细胞活性的效果。结论:回阳固本汤通过激活PI3K/Akt通路促进allo-HSCT后NK细胞重建与活性维持。

关键词 回阳固本汤; 异基因造血干细胞移植; 自然杀伤细胞; 重建; 活性

Mechanism of Huiyang Guben Decoction in Promoting Natural Killer Cell Reconstruction After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation[△]

GAO Xiaoli, HE Haitao, WANG Qi, YAO Xiangmei, QIN Tao, ZHANG Haixi, ZHAO Jie, FENG Shuai, HU Peng, YANG Tonghua (Dept. of Hematology, the First People's Hospital of Yunnan, Yunnan Clinical Research Center for Hematologic Disease, Kunming 650032, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the effects of Huiyang Guben decoction on natural killer (NK) cell reconstruction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) and its molecular mechanism. **METHODS:** (1) Clinical experiment. Totally 40 patients undergoing allo-HSCT in the hospital from Jul. 2021 to Sept. 2022 were divided into the control group ($n=20$) and HYGB group ($n=20$) according to the treatment method. The HYGB group was intervened with Huiyang Guben decoction for 4 weeks before allo-HSCT. The efficacy of two groups was evaluated after allo-HSCT treatment. The peripheral blood NK cells were counted, the expression of peripheral blood NK cell marker molecules CD56 and CD16 was detected. The peripheral blood NK cells of two groups were isolated, the cell viability was measured *in vitro*, and the expression of phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway protein was detected. (2) *In vitro* cell experiment. NK cells were isolated and cultured from the peripheral blood of healthy people, and then divided into the control group (negative control), HYGB group (intervention with Huiyang Guben decoction) and LY294002 group (intervention with Huiyang Guben decoction + PI3K inhibitor LY294002). The cell viability and apoptosis of three groups were measured. **RESULTS:** (1) The good

[△] 基金项目:国家自然科学基金(No. 82060810);云南省血液系统疾病临床医学研究中心开放项目(No. 2020LCZXKF-XY06;No. 2020LCZXKF-XY12;No. 2020LCZXKF-XY16;No. 2020LCZXKF-XY18;No. 2021LCZXKF-XY02;No. 2021LCZXKF-XY03);云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(No. 202201AY070001-244)

* 主治医师,硕士。研究方向:血液病、造血干细胞移植。E-mail:616229434@qq.com

通信作者:主任医师,硕士。研究方向:血液病、中西医结合治疗。E-mail:ynanblood@aliyun.com

rate of hematopoietic reconstruction in the control group was 90% (18/20), the recurrence rate was 10% (2/20), and the nontransplantation-related mortality was 5% (1/20). The good rate of hematopoietic reconstruction in the HYGB group was 100% (20/20), the recurrence rate was 5% (1/20), and there was no death. There was no significant difference in efficacy between two groups ($P>0.05$). However, the incidence of acute graft-versus-host disease (aGVHD) in the HYGB group was 10% (2/20), significantly lower than 45% (9/20) in the control group, the proportion of NK cells in peripheral blood and the expression of CD56 and CD16 were significantly higher than those in the control group, the proliferation activity of NK cells *in vitro* was higher than that in the control group, and the apoptosis rate was lower than that in the control group, with statistically significant differences ($P<0.05$). It was also found that PI3K/Akt pathway was significantly activated in NK cells in HYGB group compared with the control group ($P<0.05$). (2) Compared with the HYGB group, the proliferation activity of NK cells in LY294002 group decreased and the apoptosis rate increased, with statistically significant differences ($P<0.05$). LY294002 reversed the effect of Huiyang Guben decoction on promoting NK cell activity *in vitro*. CONCLUSIONS: Huiyang Guben decoction can promote the reconstruction and activity maintenance of NK cells after allo-HSCT by activating PI3K/Akt pathway.

KEYWORDS Huiyang Guben decoction; Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; Natural killer cells; Reconstruction; Activity

异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)是目前血液系统恶性疾病治疗的重要方法^[1]。allo-HSCT的成功常受到急性移植物抗宿主病(aGVHD)的限制,由于缺乏有效的预测靶点和治疗措施,降低移植物抗宿主病的发病率和严重程度仍是目前allo-HSCT治疗的主要挑战^[2-3]。多项证据表明,allo-HSCT后自然杀伤细胞(NK细胞)的早期重建与aGVHD的发病有着紧密联系,其活性的恢复对于allo-HSCT的成功至关重要^[4-7]。因此,NK细胞的重建成为近年来allo-HSCT研究的热门话题。中医认为急性髓系白血病、骨髓增生异常综合征或淋巴瘤等血液疾病大都具有共同的病机——脾肾阳虚,而脾肾两虚可造成阳气耗损、气血亏虚,治疗应以扶正固本为原则^[8-10]。回阳固本汤具有补肾温阳、健脾固本的功效,是我院临床上脾肾阳虚型患者的常用药。本研究前期发现allo-HSCT患者在移植前服用回阳固本汤可以显著提高外周血NK细胞数量与活性,表明回阳固本汤可能作为allo-HSCT的辅助治疗药物。于是,本研究开展了相应的临床与基础实验以明确其具体功效和分子调节机制,为回阳固本汤在allo-HSCT治疗中的应用提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床研究

1.1.1 资料来源:选取2021年7月至2022年9月于我院血液科行allo-HSCT的患者40例。纳入标准:年龄14~55岁,原发疾病为血液系统恶性疾病,均为首次接受allo-HSCT;中医辨证为脾肾阳虚型,即四肢怕冷、纳差、便溏、乏力、腰膝酸软,脉沉或细,舌淡或胖大、苔白或白腻。排除标准:合并严重的心、肝、肾等脏器衰竭者;不能配合治疗与服药者;临床资料不全者。本研究为开放研究,根据患者选择的治疗方式分组,将20例allo-HSCT联合回阳固本汤的患者纳入HYGB组,将另外20例选择allo-HSCT单独治疗的患者作为对照组。两组患者的年龄、性别、原发疾病、供者类型、CD34⁺细胞输注量及移植后住院时间等一般资料具有可比性,见表1。本研究已通过我院医学伦理委员会审批(伦理审批号:KHL2022-KY125),患者及其家属对本研究内容均已知情,并签署知情同意书。

1.1.2 方法:所有患者均接受髓系预处理,亲缘全相合供者

表1 两组患者一般资料比较

Tab 1 Comparison of general information between two groups

项目	对照组(n=20)	HYGB组(n=20)	χ^2/z	P
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	33.68±12.49	36.17±11.84	0.647	0.521
性别/例(%)				
男性	13(65)	11(55)	0.417	0.519
女性	7(35)	9(45)		
原发疾病/例(%)				
急性髓细胞白血病	9(45)	11(55)	1.043	0.791
急性淋巴细胞白血病	5(25)	3(15)		
骨髓增生异常综合征	3(15)	2(10)		
高侵袭性淋巴瘤	3(15)	4(20)		
供者类型/例(%)				
全相合	8(40)	7(35)	0.107	0.744
单倍体相合	12(60)	13(65)		
中位CD34 ⁺ 细胞输注量(范围)/ ($\times 10^6$ 细胞/kg)	5.24(1.95~10.20)	4.93(1.62~8.85)	0.933	0.351
中位移植后住院时间(范围)/d	17(16~30)	16(13~28)	1.773	0.076

allo-HSCT的aGVHD预防采用环孢素A+甲氨蝶呤方案;亲缘单倍体供者采用环孢素A+甲氨蝶呤+吗替麦考酚酯方案预防aGVHD。HYGB组患者在最后1次化疗结束至移植预处理前服用回阳固本汤,连续干预4周。回阳固本汤配方:附子颗粒9g,生姜30g,炙甘草9g,肉桂9g,生晒参9g,砂仁5g,盐小茴香5g,五味子5g,当归9g,黄连5g,醋乌梅5g,花椒5g,鸡内金9g,焦麦芽9g;1日1剂,水煎服,分早晚2次温服。

1.1.3 疗效评定标准:造血重建标准:allo-HSCT结束后,在未使用粒细胞集落刺激因子的情况下,当中性粒细胞绝对值 $>0.5\times 10^9/L$ 持续3d,以第1日作为中性粒细胞植入日期;同时,在脱离血小板输注情况下,当血小板计数 $>20\times 10^9/L$ 持续7d,以第1日作为血小板植入日期^[11]。中性粒细胞与血小板植入时间未超过28d视为造血重建良好,否则视为造血重建不良。同时,统计90d内复发及死亡例数。

1.2 细胞实验

1.2.1 材料:(1)仪器。CO₂培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);聚合酶链反应(PCR)仪(美国 ABI 公司);电泳仪(北京六一生物技术有限公司);酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司)。

(2) 试剂。人外周血单个核细胞(PBMC)分离试剂盒与人NK细胞分离试剂盒均购自天津科维诺生物科技有限公司;IMDM培养基、Hanks溶液购自美国Sigma公司;RNeasy提取试剂盒、逆转录试剂盒与SYBR Green试剂均购自德国QIAGEN公司;CCK-8溶液、磷酸盐缓冲液、重组白细胞介素(IL)15、胰蛋白酶与RIPA裂解缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司;所有抗体购自英国Abcam公司;10%人血清购自武汉艾美捷科技有限公司;Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2.2 方法:(1)NK细胞计数。分别于allo-HSCT前、allo-HSCT后第30、60和90日采集两组患者外周血4~5 mL,采用Hanks溶液等体积稀释后,使用人PBMC分离试剂盒、根据密度梯度离心法于1 500 r/min离心15 min(离心半径10 cm),获取PBMC,以磷酸盐缓冲液重新悬浮细胞,避光条件下采用PerCP-Cy5.5-抗CD3抗体、PE-抗CD56抗体、FITC-抗CD16抗体标记20 min,采用流式细胞仪分析CD3⁻CD56⁺CD16⁺NK细胞比例,以对照组作为基准,计算相对比例。

(2)NK细胞分离培养。随机选取对照组与HYGB组患者外周血各3份来提取NK细胞,分离PBMC,使用人NK细胞分离试剂盒分离NK细胞,分离后采用流式细胞仪鉴定CD3⁻CD56⁺CD16⁺,纯度为94.1%~96.8%。随后重悬1×10⁶个细胞于IMDM培养基(含有10%人血清、0.5 g/mL IL-15),将培养基置于37℃培养箱中培养48 h后,进行以下实验。每实验设置3个复孔。

(3)实时荧光定量PCR。采用PCR检测外周血中CD15与CD56的表达量,首先使用RNeasy提取试剂盒提取PBMC中的总RNA,然后使用逆转录试剂盒合成cDNA,最后使用SYBR Green试剂进行实时荧光定量PCR,于PCR仪上分析并计算相对甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的表达量(2^{-ΔΔCt}法)。

(4)细胞活性检测。采用CCK-8法评价细胞活性,将分离培养的NK细胞以2×10³细胞/孔的密度接种于96孔板中,分别培养0、24、48和96 h,向每个孔中加入CCK-8溶液(10 μmol/L)于37℃孵育2 h后,用酶标仪测量细胞在450 nm波长下的吸光度(OD值)。

(5)细胞凋亡分析。收集细胞并将细胞密度调整为1×10⁶个/mL,使用胰蛋白酶消化后,分别与Annexin V-FITC、PI结合缓冲液混合,孵育30 min,采用流式细胞仪分析细胞凋亡率。

(6)蛋白质印迹法。以RIPA裂解缓冲液提取NK细胞总

蛋白,凝胶电泳分离蛋白条带并转膜,使用1:1 000稀释的一级抗体进行蛋白质印迹分析,随后与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育,使用凝胶成像分析仪进行拍照,并使用Image J软件量化条带强度,以GAPDH作为内参,计算相对表达量。每样本设置3个重复,计算平均值。

(7)细胞分组干预。从患者外周血中分离培养NK细胞,分为对照组、HYGB组和LY294002组,HYGB组细胞采用回阳固本汤干预,LY294002组细胞在回阳固本汤干预的同时加入LY294002 50 μmol/L干预24 h,随后分别检测各组细胞活性与凋亡情况。

1.3 统计学方法

采用Prism 8.0软件进行数据的统计分析与图形绘制,首先进行方差齐性检验,满足方差齐性的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析与独立样本t检验进行组间比较,方差不齐的如CD34⁺细胞输注量、移植后住院时间以中位数($P_{25} \sim P_{75}$)表示,采用非参数检验中的秩和检验分析;计数资料以率(%)的方式表示,采用 χ^2 检验、Fisher精确检验进行组间比较;检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 allo-HSCT患者近期临床效果评价及不良反应发生情况分析

两组患者在移植后90 d内均未发生移植相关死亡,对照组90%(18/20)的患者造血重建良好,HYGB组100%(20/20)的患者造血重建良好。在移植后3个月内,对照组患者复发2例,非移植相关死亡1例;HYGB组患者复发1例,未出现死亡。两组患者近期疗效比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。同时统计患者不良反应发生率,结果显示,两组患者消化道症状(恶心、呕吐和腹泻)、感染和肝功能损害的发生率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);HYGB组患者aGVHD发生率显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表2 两组患者allo-HSCT后临床效果比较[例(%)]

Tab 2 Comparison of clinical effects between two groups after allo-HSCT [cases (%)]

组别	造血重建良好	造血重建不良	复发	非移植相关死亡
HYGB组(n=20)	20(100)	0(0)	1(5)	0(0)
对照组(n=20)	18(90)	2(10)	2(10)	1(5)
Fisher	—		—	—
P	0.487		1.000	1.000

注:“—”表示无具体检验值。

Note:“—” indicates no specific test value.

表3 两组患者allo-HSCT后90 d内不良反应比较[例(%)]

Tab 3 Comparison of adverse drug reactions within 90 d after allo-HSCT between two groups [cases (%)]

组别	消化道症状	感染	肝功能损害	aGVHD		合计
				I—II级	III—IV级	
HYGB组(n=20)	3(15)	1(5)	1(5)	2(10)	0(0)	2(10)
对照组(n=20)	5(25)	3(15)	1(5)	6(30)	3(15)	9(45)
Fisher χ^2	—	—	—	—	—	6.144
P	0.695	0.605	1	0.235	0.231	0.013

注:“—”表示无具体检验值。

Note:“—” indicates no specific test value.

2.2 回阳固本汤对allo-HSCT后患者体内CD3⁻CD56⁺CD16⁺NK细胞比例的影响

allo-HSCT进行0 d时,两组患者CD3⁻CD56⁺CD16⁺NK细

胞比例,CD56、CD16表达量的差异均无统计学意义($P > 0.05$);但allo-HSCT后30、60和90 d时,HYGB组患者CD3⁻CD56⁺CD16⁺NK细胞比例,CD56、CD16表达量显著高于

对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图1。

2.3 回阳固本汤对 allo-HSCT 患者来源 NK 细胞体外活性的影响

与对照组相比, HYGB 组患者 NK 细胞活性显著升高, 细胞凋亡率显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见图2。

2.4 回阳固本汤对患者来源 NK 细胞内 PI3K/Akt 信号通路的影响

与对照组相比, HYGB 组患者 NK 细胞内磷酸化的 PI3K (p-PI3K) 和磷酸化的 Akt (p-Akt) 的表达水平显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 HYGB 组与对照组总的 Akt 和

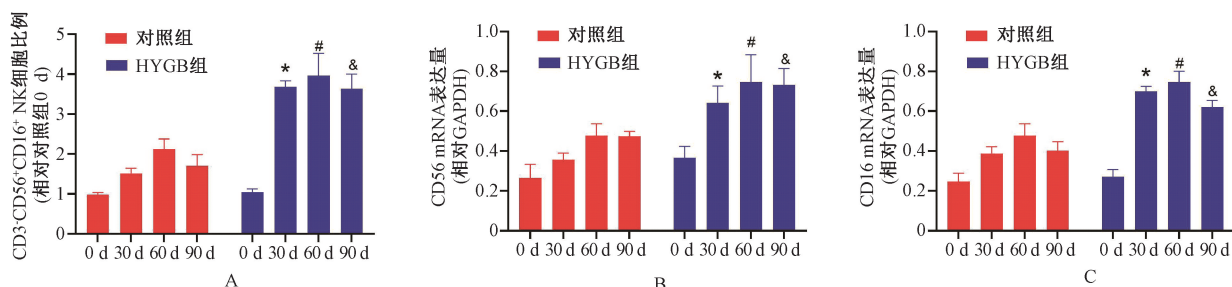
PI3K 表达水平的差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图3。

2.5 PI3K 抑制剂对回阳固本汤提高 NK 细胞体外活性的影响

与 HYGB 组比较, HYGB+LY294002 组 NK 细胞活性显著降低, 而细胞凋亡比例显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 该结果逆转了 HYGB 提高 NK 细胞活性的效果, 见图4。

3 讨论

NK 细胞是机体免疫防御的前线细胞, 能够识别并杀死恶性肿瘤细胞或病毒感染细胞^[12-13]。目前, 人们对 NK 细胞相关分子调节通路的理解仍显不足, NK 细胞在防止 allo-HSCT 后

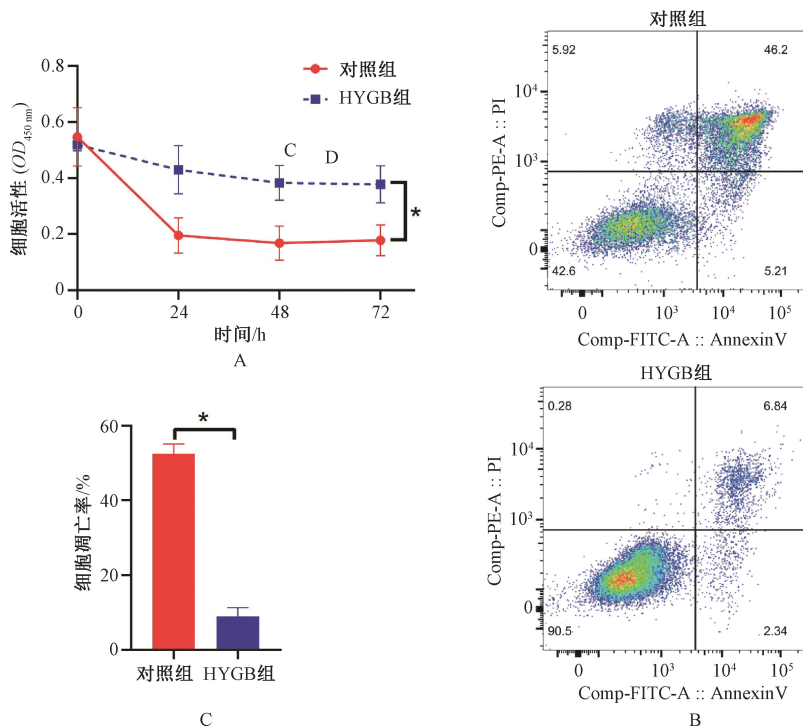


A. 流式细胞术检测 allo-HSCT 后 0 d、30 d、60 d 与 90 d 时患者外周血 CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK 细胞比例; B—C. PCR 检测 NK 细胞标志 CD56 (B) 与 CD16 (C) 的表达; * $P < 0.05$ 。

A. proportion of CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK cells in peripheral blood of patients at 0, 30, 60 and 90 d after allo-HSCT detected by flow cytometry; B-C. expression of NK cell markers CD56 (B) and CD16 (C) detected by PCR; * $P < 0.05$.

图1 回阳固本汤对 allo-HSCT 后患者体内 NK 细胞比例的影响

Fig 1 Effects of Huiyang Guben decoction on proportion of NK cells in patients after allo-HSCT

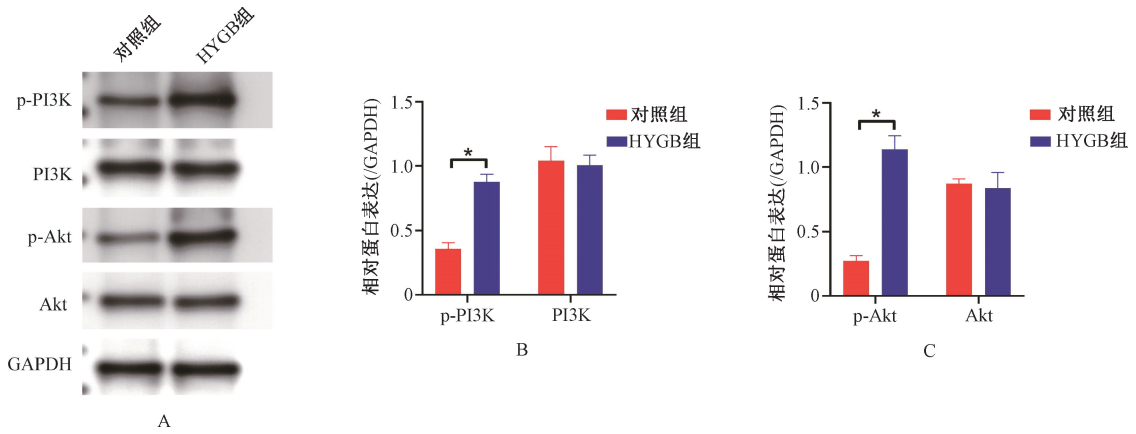


A. CCK8 实验检测 NK 细胞在 450 nm 处的吸光值; B—C. 流式细胞术测定两组 NK 细胞 Annexin V-FITC/PI 双染情况与细胞凋亡率; $n = 3$, * $P < 0.05$ 。

A. absorbance of NK cells at 450 nm detected by CCK8 assay; B-C. Annexin V-FITC/PI double staining and apoptosis rate of NK cells in both groups detected by flow cytometry; $n = 3$, * $P < 0.05$.

图2 回阳固本汤对 allo-HSCT 患者来源 NK 细胞体外活性影响

Fig 2 Effects of Huiyang Guben decoction on *in vitro* activity of NK cells derived from allo-HSCT patients

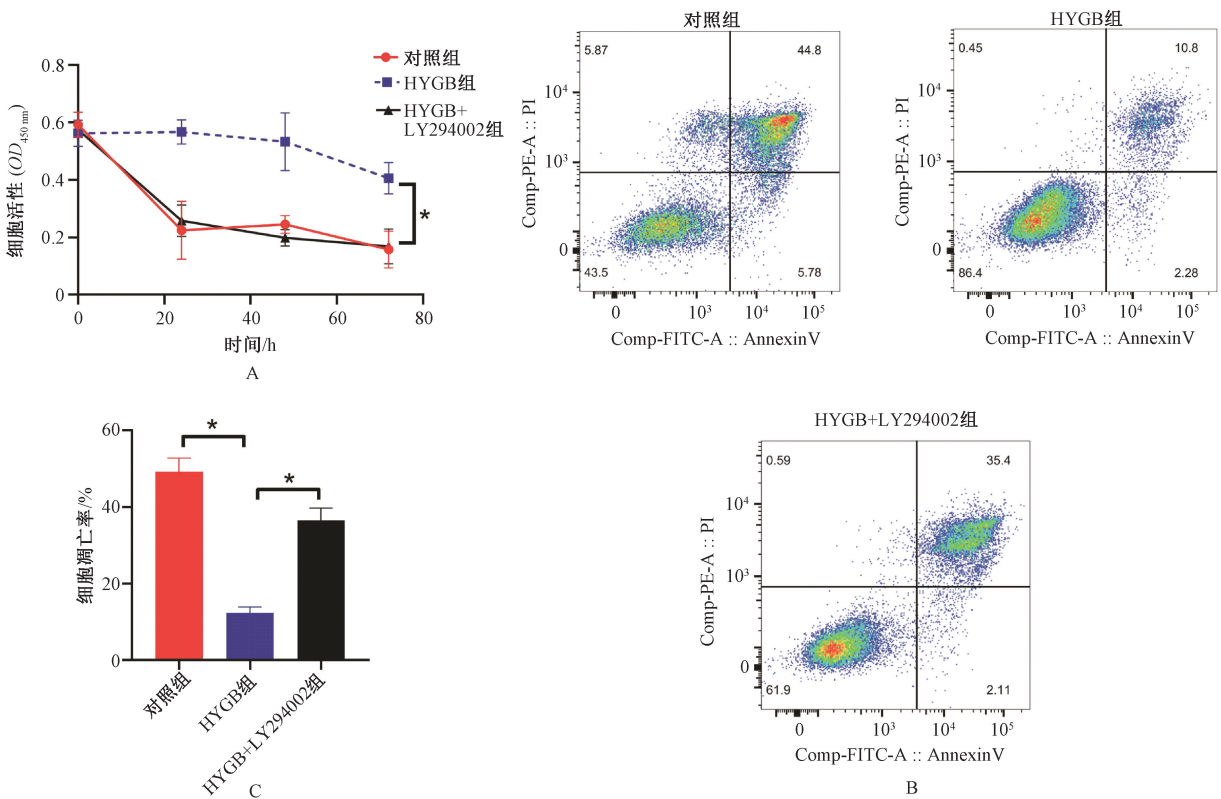


A—C. 蛋白质印迹法检测 NK 细胞内 p-Akt、Akt、p-PI3K 和 PI3K 蛋白的表达水平; $n=3$, * $P<0.05$ 。

A—C. proteins expression levels of p-Akt, Akt, p-PI3K and PI3K in NK cells detected by Western blotting; $n=3$, * $P<0.05$ 。

图 3 回阳固本汤对 NK 细胞内 PI3K/Akt 信号通路的影响

Fig 3 Effects of Huiyang Guben decoction on PI3K/Akt signaling pathway in NK cells



A. CCK8 实验检测三组 NK 细胞在 450 nm 处的吸光值; B—C. 流式细胞术测定三组 NK 细胞 Annexin V-FITC/PI 双染情况与细胞凋亡率; $n=3$, * $P<0.05$ 。

A. absorbance of three groups of NK cells at 450 nm detected by CCK8 assay; B-C: Annexin V-FITC/PI double staining and apoptosis rate of NK cells in three groups detected by Flow cytometry; $n=3$, * $P<0.05$ 。

图 4 PI3K 抑制剂对回阳固本汤提高 NK 细胞体外活性的影响

Fig 4 Effects of PI3K inhibitor on enhancement of NK cell activity *in vitro* by Huiyang Guben decoction

aGVHD 的潜力,值得更进一步研究探索。

目前,中药汤剂已被广泛用于多种疾病的临床治疗,包括各类血液系统疾病。张国梁等^[14]指出,采用髓白 1 号方联合化疗治疗急性髓细胞白血病,显著提高了患者的缓解率,降低了复发率;王永敏等^[15]发现,益髓补肾方可以显著增强患者的

免疫功能,改善恶性淋巴瘤化疗患者相关性贫血。本研究首先采用回阳固本汤辅助 allo-HSCT 治疗血液系统恶性疾病患者,结果发现,回阳固本汤虽然在疗效改善方面与对照组的差异无统计学意义($P>0.05$),可能是由于样本数量偏小导致的差异不显著;但数据显示,回阳固本汤可显著降低患者移植后 9 个

月内 aGVHD 的发生率。中医认为,各类血液系统恶性疾病,无论是急性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、骨髓增生异常综合征或高侵袭性淋巴瘤等,都源于气血不足,毒邪侵体,与西医的自身免疫功能低下的病因相通^[16-18]。因此,其治疗应以扶正为主,鼓舞正气,解毒为辅,抵御毒邪,增强机体免疫功能,恢复各脏器功能,为移植后造血干细胞的存活、分化创造条件。回阳固本方中,制附片回阳救逆、补火助阳;生姜与黄连解毒;炙甘草作为补益剂,具有益气滋阴、通阳复脉的功效;姜半夏消痞散结;生晒参具有补元养血、调节心血管系统及免疫功能的作用;当归补血活血;各药合用,共奏回阳固本之效。

在分子机制上,本研究结果发现,接受回阳固本汤干预的患者,其外周血 NK 细胞比例显著升高,且 NK 细胞体外增殖活性增强,凋亡率降低。该结果说明,回阳固本汤可以促进 NK 细胞的早期重建,提高 NK 细胞活性。此外,本研究结果显示,回阳固本汤显著激活了 NK 细胞中的 PI3K/Akt 通路。PI3K/Akt 信号与细胞增殖、凋亡等细胞生物学过程密切相关,并且多项研究结果证实该信号参与了 NK 细胞活性的调控^[19-20]。本研究通过体外细胞实验继续探究 PI3K/Akt 是否参与了回阳固本汤对 NK 细胞活性的调控,采用 PI3K 抑制剂 LY294002 协同回阳固本汤一起干预 NK 细胞,结果显示,LY294002 导致 NK 细胞增殖活性降低、凋亡率升高,逆转了回阳固本汤在体外促进 NK 细胞活性的效果。

本研究报道了回阳固本汤用于辅助 allo-HSCT 治疗的增益作用,并揭示了详细的分子调控机制。但是本研究也存在一定的局限性:(1)由于实验条件的限制,本研究中未能探究回阳固本汤对于 NK 细胞分型及杀伤活性的影响机制;(2)本研究中的临床研究仅为单中心、小样本研究,可能导致结果呈现一定程度的偏倚,未来或可联合多中心进行更大样本的临床研究,以验证本研究结论。

综上所述,回阳固本汤通过激活 PI3K/Akt 通路促进了 allo-HSCT 后 NK 细胞的重建与活性维持,将有助于预防治疗过程中 aGVHD 的发生,并可能进一步提升 allo-HSCT 成功率。本研究结果可能为回阳固本汤在 allo-HSCT 治疗中的应用提供科学的理论依据。

参考文献

- [1] MARTÍNEZ-LAPERCHÉ C, BUCES E, AGUILERA-MORILLO M C, et al. A novel predictive approach for GVHD after allogeneic SCT based on clinical variables and cytokine gene polymorphisms [J]. *Blood Adv*, 2018, 2(14): 1719-1737.
- [2] GHIMIRE S, WEBER D, HIPPE K, et al. GPR expression in intestinal biopsies from SCT patients is upregulated in GvHD and is suppressed by Broad-Spectrum antibiotics [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 753287.
- [3] ZHAO Y M, SHI J M, LUO Y, et al. Calcineurin inhibitors replacement by ruxolitinib as graft-versus-host disease prophylaxis for patients after allogeneic stem cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2020, 26(5): e128-e133.

- [4] SONG Y, HU B, LIU Y H, et al. IL-12/IL-18-preactivated donor NK cells enhance GVL effects and mitigate GvHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Eur J Immunol*, 2018, 48(4): 670-682.
- [5] 万露露, 陈健琳, 徐诚, 等. 异基因造血干细胞移植后 NK 细胞重建与急性移植物抗宿主病相关性的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(2): 530-534.
- [6] ULLRICH E, SALZMANN-MANRIQUE E, BAKHTIAR S, et al. Relation between acute GVHD and NK cell subset reconstitution following allogeneic stem cell transplantation [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 595.
- [7] 卢佳配, 温树鹏, 王福旭, 等. 恶性血液病异基因造血干细胞移植后复发单中心临床分析 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2022, 30(4): 1238-1243.
- [8] 李伟, 高彩凤, 柴铁. 中医健脾益肾法联合化疗治疗老年急性髓系白血病的疗效 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(3): 566-569.
- [9] 娜仁高娃. 补脾益肾方联合阿扎胞苷治疗脾肾阳虚型骨髓增生异常综合征的疗效观察 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2021.
- [10] 孙月蒙, 刘冬, 张璇, 等. 李全教授治疗恶性淋巴瘤经验拾遗 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(15): 1645-1648.
- [11] 平措卓嘎, 左旭盈, 王剑利, 等. 化疗序贯自体造血干细胞移植治疗淋巴瘤的疗效评价及影响因素分析 [J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(3): 509-513.
- [12] 曹勋红, 王志东, 韩伟, 等. 供者淋巴细胞输注治疗无效的移植后复发患者过继性回输 NK 细胞的免疫学变化和临床疗效 [J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(16): 1993-2000.
- [13] 曾海荣, 黄丹, 张建军, 等. 外周血 NK 细胞、CD8⁺T 淋巴细胞水平预测早期卵巢癌患者腹腔镜术后淋巴结转移分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2022, 43(14): 1684-1688.
- [14] 张国梁, 潘铭, 王艳芝, 等. 髓白 1 号方联合化疗对急性髓系白血病患者骨髓中 Th17 细胞的调控作用研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2021, 29(2): 328-332.
- [15] 王永敏, 郑雪梅, 刘英, 等. 益髓补肾方改善恶性淋巴瘤化疗患者相关性贫血及对免疫功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(19): 180-185.
- [16] 杨茜茹, 李冬云, 向郭华, 等. 基于痰瘀相关理论探讨恶性淋巴瘤的治疗思路 [J]. *河北中医*, 2022, 44(1): 135-138.
- [17] 魏建孔, 沈菲, 张雪杨, 等. 中医药辨治骨髓增生异常综合征的研究进展 [J]. *新疆中医药*, 2021, 39(5): 101-103.
- [18] 李柳, 麻柔. 含神古方青黄散治疗恶性血液系统疾病 [J]. *医学研究杂志*, 2019, 48(12): 1-3.
- [19] LIU H W, BI W T, HUANG H T, et al. Satb1 promotes Schwann cell viability and migration via activation of PI3K/AKT pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(13): 4268-4277.
- [20] XIAO W B, LIU Y W, DAI M L, et al. Rotenone restrains colon cancer cell viability, motility and epithelial-mesenchymal transition and tumorigenesis in nude mice via the PI3K/AKT pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(2): 700-708.

(收稿日期:2022-11-22 修回日期:2023-06-01)