

高三尖杉酯碱对急性单核细胞白血病 SHI-1 细胞株诱导凋亡机制的研究

赵雨辰, 杨明珍

摘要 目的 研究高三尖杉酯碱(HHT)作用于急性单核细胞白血病(AML-M5) SHI-1 细胞株的机制, 是否可抑制 SHI-1 细胞的增殖、诱导细胞凋亡; 了解 HHT 对 AML-M5 SHI-1 细胞膜电位的影响, 即其诱导的细胞凋亡是否通过线粒体介导的细胞凋亡途径实现。方法 将不同浓度(5、10、50、100、500 $\mu\text{g/L}$)的 HHT 作用 SHI-1 细胞, 瑞氏染色观察细胞镜下形态学改变、流式细胞术 AnnexinV-FITC/PI 法检测细胞凋亡、CCK-8 法测细胞增殖抑制作用、线粒体膜电位试剂盒(线粒体染料 JC-1 活细胞染色)检测线粒体跨膜电位($\Delta\psi_m$)变化。结果 HHT 能有效抑制 SHI-1 细胞的增殖、诱导其凋亡, 随着药物浓度的增高, 细胞死亡率、增殖抑制率明显增加($P < 0.05$)。流式细胞仪线粒体膜电位结果表明, HHT 作用后存在明显荧光变化, 细胞线粒体膜电位下降, 并呈浓度相关性。结论 HHT 可抑制 AML-M5 SHI-1 细胞株的增殖、诱导其凋亡, 其诱导细胞凋亡可能是通过线粒体介导的细胞凋亡途径实现。

关键词 高三尖杉酯碱; SHI-1 细胞; 急性单核细胞白血病; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号 R 733.71; R 979.1+9; R 329.2+5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)08-1080-05

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是血液系统的克隆性恶性疾病, 急性单核细胞白血病(acute monocytic leukemia, AML-M5)是 AML 中预后较差的亚型。复发难治、低增生及老年 AML-M5 患者并发症多、缓解率低、对化疗耐受差或不敏感, 是血液科治疗的重点及难点^[1]。高三尖杉酯碱(homoharringtonine, HHT)是从我国海南植物粗榧中提取出的生物碱, 是我国在世界上首先用于治疗急性非淋巴细胞白血病(acute non-lymphocytic leukemia, ANLL)的药物, 并获得显著疗效^[2], 在上世纪 70 年代已用于 AML 等的治疗, 临床上常用于治疗难治复发白血病, 研究^[3]表明其作用机制与诱导多种细

胞凋亡、抑制 DNA 合成等有关。体外实验^[4]显示, HHT 对 AML-M5 SHI-1 细胞系有明显促凋亡作用。常规剂量或浓度时, 可抑制真核细胞蛋白质合成, 肿瘤细胞分裂指数减少, 瘤组织核酸含量下降^[5]。前期体外实验^[6]结果显示, HHT 能够抑制白血病 NB4 细胞的增殖, 诱导凋亡。该实验拟对 HHT 促 SHI-1 细胞凋亡作用机制作一探讨, 为 HHT 治疗难治复发急性白血病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 SHI-1 细胞为 AML-M5 细胞株, 由苏州大学医学院第一附属医院血液科实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂 HHT 购自杭州民生药业集团有限公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; RPMI 1640 培养液购自美国 Gibco 公司; AnnexinV-FITC/PI 试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; CCK-8 试剂盒、线粒体膜电位试剂盒(线粒体染料 JC-1 活细胞染色)均购自上海贝博公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 AML-M5 SHI-1 细胞置于含青霉素(100 U/ml)和链霉素(100 g/ml)及 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养, 2~3 d 传代 1 次, 细胞接种后, 每日计数细胞数, 连续观察 7~10 d, 在对数坐标纸上绘制细胞生长曲线。当细胞形态逐渐浑圆, 透亮, 大小均一, 排列整齐, 确定曲线基本呈水平的部分即为指数生长期。取处于指数生长期细胞进行实验。

1.2.2 瑞氏染色细胞形态学观察 取对数生长期的 SHI-1 细胞, 将浓度为 500 $\mu\text{g/L}$ 的 HHT 加入培养体系, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱培养 20 h, 普通光镜下观察对比正常细胞与药物处理后细胞形态学变化。无菌操作下收集药物处理后的细胞(密度约为 1×10^6 个/ml), 1 000 r/min, 离心 2 min, 弃净上清液, 加入约 10 μl 胎牛血清, 涂片, 常规瑞氏染色后光镜下观察细胞形态学改变并摄片。

1.2.3 AnnexinV-FITC/PI 流式细胞仪分析 取对数生长期 SHI-1 细胞进行实验。调整细胞至适宜浓

2014-02-25 接收

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目(编号: KJ2011A164)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院血液内科, 合肥 230022

作者简介: 赵雨辰, 女, 硕士研究生;

杨明珍, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yangmz89@163.com

度(约为 5×10^5 /ml)后,分别用 5、10、50、100、500 $\mu\text{g/L}$ HHT 处理 SHI-1 细胞,以相同条件下不加药物为对照组,接种于 6 孔板内,置于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度孵箱孵育,20 h 后收集细胞(1×10^6 /L),PBS 洗 2 次,加 490 μl 结合缓冲液,混匀后加 5 μl Annexin-V-FITC 和 5 μl PI 液,避光孵育 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.4 CCK-8 法检测增殖能力 取对数生长期的 SHI-1 细胞,浓度调整为 5×10^5 /ml,用 5、10、50、100、500 $\mu\text{g/L}$ 不同浓度 HHT 作用于细胞,设对照组(不加药)和空白对照组(只加培养液,无细胞),每组另设 3 个复组,用 CCK-8 法(具体操作参照试剂盒说明书)测出相应 450 nm 处吸光度(A_{450})值。实验重复 3 次,取平均值,根据公式:细胞活力(%) = $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(\text{对照}) - A(\text{空白})] \times 100\%$,计算细胞活力。

1.2.5 线粒体跨膜电位($\Delta\psi_m$)检测 用 100 $\mu\text{g/L}$ HHT(此浓度接近 24 h IC_{50} 值)及 500 $\mu\text{g/L}$ 处理 SHI-1 细胞,无菌操作下收集药物处理前后细胞(密度约为 1×10^6 个/ml),细胞用 JC-1 液 37°C 孵育 15 min,依照线粒体膜电位试剂盒说明书步骤测线粒体跨膜电位,上流式细胞仪用 PI 和 FITC 荧光通道检测。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用非配对 t 检验进行结果分析。

2 结果

2.1 HHT 处理前后瑞氏染色细胞形态学观察 光镜下未经药物作用的 SHI-1 细胞生长状态良好,呈中等大小,排列整齐,细胞呈圆型,胞质透明,核圆,规则,胞质量中等至丰富,染灰蓝色,部分细胞胞质中可见少量淡紫红色颗粒,细胞密度较大。而经 HHT 作用后的细胞形态出现不规则、胞质皱缩、核浓缩、染色体凝集,细胞破裂,细胞密度明显减少。见图 1。

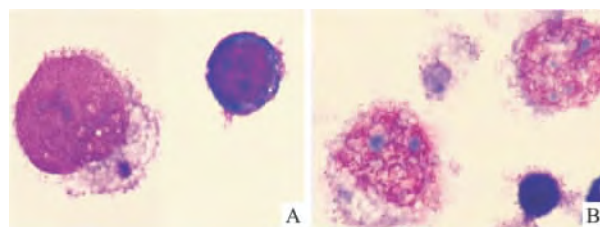


图1 药物处理前后细胞形态学改变 瑞氏染色 $\times 1000$

A: 未经药物处理; B: 500 $\mu\text{g/L}$ HHT 处理

2.2 HHT 对 SHI-1 细胞凋亡的影响 Annexin-V-FITC/PI 法实验结果示: 浓度为 5 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 的 HHT 处理 SHI-1 细胞 20 h 后,与不加药对照组相比,药物处理后的 SHI-1 细胞凋亡率明显升高,当 HHT 药物浓度 5、10、50、100、500 $\mu\text{g/L}$ 时,统计得细胞凋亡率(%)分别为: (9.12 ± 0.780) 、 (11.23 ± 0.956) 、 (14.60 ± 0.867) 、 (30.29 ± 1.335) 、 (42.61 ± 1.393) [不加药对照组细胞凋亡率 (4.11 ± 0.863)],且随药物浓度的升高,细胞凋亡率增加,表现为一定的剂量依赖性($P < 0.05$)。见表 1、图 2。

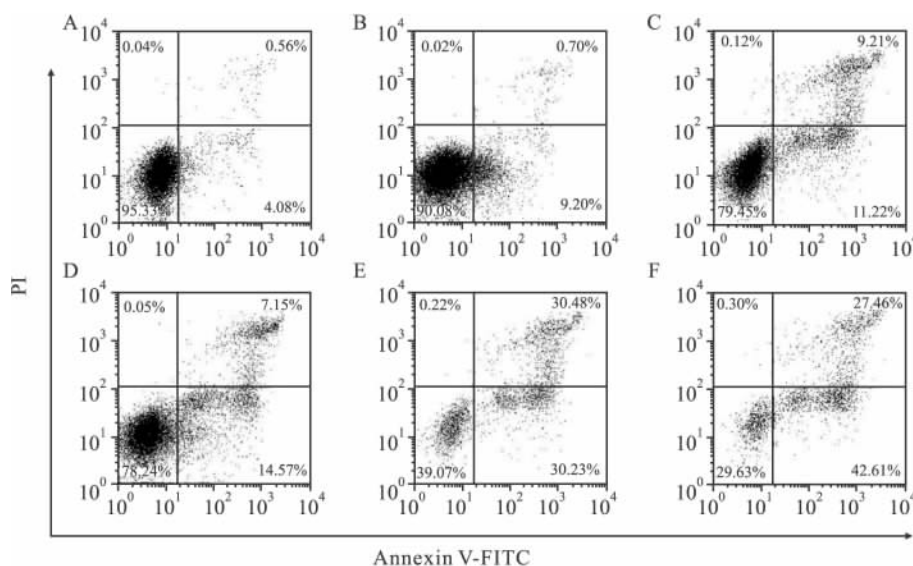


图2 不同浓度 HHT 作用 SHI-1 细胞 20 h 凋亡情况

A: 不加药对照组; B: HHT 5 $\mu\text{g/L}$ 组; C: HHT 10 $\mu\text{g/L}$ 组; D: HHT 50 $\mu\text{g/L}$ 组; E: HHT 100 $\mu\text{g/L}$ 组; F: HHT 500 $\mu\text{g/L}$ 组

2.3 HHT 对 SHI-4 细胞的增殖抑制 当 HHT 药物浓度分别为 5、10、50、100、500 $\mu\text{g/L}$ 时,酶标仪测得 450 nm 处平均吸光值分别为:0.484、0.478、0.468、0.366、0.327,空白对照组平均吸光值为 0.312,不加药对照组平均吸光值为 0.817,根据公式计算细胞活力(%)分别为:(34.18 ± 0.662), (32.92 ± 0.991), (30.90 ± 0.633), (10.10 ± 0.654), (2.87 ± 0.550) [不加药对照组细胞活力为(57.52 ± 0.680)]。提示药物作用后细胞活力下降,且在药物浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ (IC_{50} 值)及更高浓度时开始出现明显下降。见表 1、图 3。

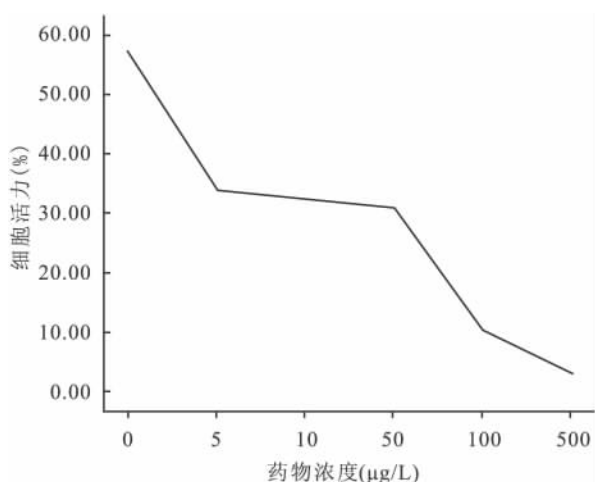


图3 不同浓度(5~500 $\mu\text{g/L}$) HHT 作用 20 h 后细胞活力

表1 不同浓度 HHT 作用 SHI-4 细胞 20 h 的凋亡率和增殖抑制(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率($n=5$)	增殖抑制(细胞活力, $n=6$)
不加药对照	4.11 ± 0.863	57.52 ± 0.680
HHT 处理($\mu\text{g/L}$)		
5	$9.12 \pm 0.780^*$	$34.18 \pm 0.662^*$
10	$11.23 \pm 0.956^*$	$32.92 \pm 0.991^*$
50	$14.60 \pm 0.867^*$	$30.90 \pm 0.633^*$
100	$30.29 \pm 1.335^*$	$10.10 \pm 0.654^*$
500	$42.61 \pm 1.393^*$	$2.87 \pm 0.550^*$

与不加药对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 HHT 作用细胞后线粒体膜电位变化 流式细胞仪结果示,HHT 药物作用后出现明显荧光变化,细胞线粒体膜电位下降。当 HHT 浓度为 100、500 $\mu\text{g/L}$ 时,线粒体膜电位降低,早期细胞凋亡率分别为 18.12% 及 30.77%,较不加药对照组细胞(凋亡率 0.73%)明显升高。细胞凋亡的百分率,即 Annexin-V FITC/PI 阳性和线粒体膜电位下降的细胞百分率是相近的,提示 HHT 诱导细胞凋亡可能与线粒体膜电位下降有关。见图 4。

3 讨论

AML 是造血干祖细胞的恶性克隆性疾病,发病时骨髓中异常的原始及幼稚细胞(白血病细胞)大量增殖,抑制正常造血,并广泛浸润肝脏、脾脏、淋巴结。细胞增殖失控、分化障碍和凋亡受阻是白血病细胞的基本特征,诱导分化和凋亡疗法已成为白血病的两个治疗策略^[9]。细胞凋亡是细胞的一种生理性死亡过程,凋亡的发生是通过一系列复杂的信号传导通路和基因的调控、多种刺激因素共同作用的,多种抗肿瘤药物都能诱导细胞的凋亡^[10]。线粒体是细胞凋亡调控网络中重要的细胞器,是早期细胞凋亡的标志^[11]。大多数凋亡信号通过诱导线粒体膜通透性转运通道(mitochondrial permeability transition pore, MPT)的开放或线粒体肿胀导致线粒体膜电位下降,允许线粒体呼吸链蛋白细胞色素 C、凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)从线粒体释放到胞质^[12]。HHT 能够抑制 G_1 和 G_2 蛋白的合成,诱导细胞分化,促进细胞凋亡^[13]。刘佳宁等^[9]、任艳玲等^[14]研究发现,HHT 的作用机制与诱导多种细胞凋亡、抑制 DNA 合成等有关。亦有实验^[15]显示,HHT 单药即可以一种剂量-依赖的方式抑制 THP-1 细胞及 Kasumi 细胞的生长,诱导上述细胞的凋亡。HHT 能够显著下调 PI3 K 基因的表

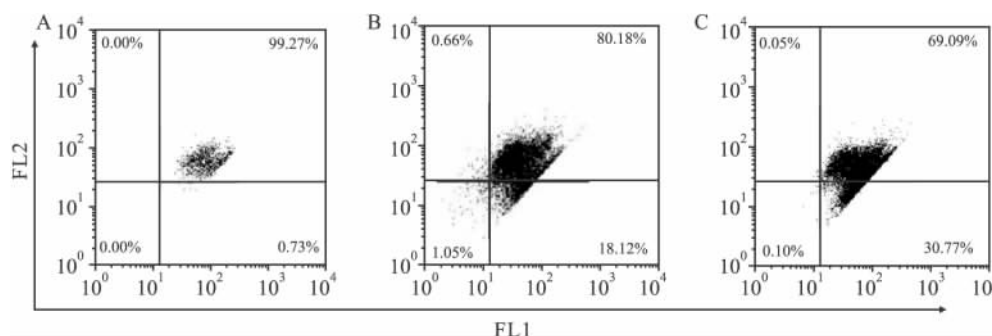


图4 JC-1 活细胞染色线粒体膜电位

A:不加药对照组;B:HHT 100 $\mu\text{g/L}$ 组;C:HHT 500 $\mu\text{g/L}$ 组

达。研究^[12-14]显示,许多 BCL-2 家族成员和 AKT 及 JAK/STAT 信号通路在 HHT 介导的抗白血病细胞过程中起着一定的作用。苏州大学陈苏宁等^[3]通过对 1 例 AML-M5b 患者的骨髓细胞进行体外传代培养,建立了国内第 1 个人单核细胞白血病细胞系,该细胞倍增时间约为 36 h,以 t(6;11)(q27;q23)、MLL-AF6 融合基因及 del(17)(p11)和 p53 基因异常为主要特征,命名为 SHI-1。本实验研究显示,HHT 在 5~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内可有效抑制 AML-M5 细胞株 SHI-1 细胞的增殖,5 $\mu\text{g/L}$ 的 HHT 即可特异诱导 SHI-1 细胞凋亡。随着药物浓度的增加,细胞早期凋亡率相应增高,细胞活力明显下降,呈现较好的剂量效应关系。细胞凋亡形态在电镜下表现为细胞核皱缩,核染色质浓缩呈块状边聚于核膜下,核仁消失。而在细胞凋亡的过程中,亦检测出线粒体膜电位的平行下降,表明 SHI-1 细胞的凋亡和增殖抑制与线粒体膜电位有关。以上实验结果初步表明,HHT 诱导的细胞凋亡很可能是通过线粒体介导的细胞凋亡途径实现的,线粒体介导的细胞凋亡途径可能是 HHT 诱导 AML-M5 SHI-1 细胞凋亡的机制之一。该结果为 HHT 治疗难治愈急性白血病提供了一定的理论依据,今后的相关信号通路及基因水平的研究尚需进一步实验探讨。

参考文献

- [1] 吉宇莹,张王刚,陈银霞. GHA 预激方案治疗急性单核细胞白血病的机制及临床研究 [J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(1):213-8.
- [2] 蔡真,林茂芳,Christan W,等. 线粒体膜电位在高三尖杉酯碱诱导 T 淋巴细胞白血病细胞 Molt3 凋亡中的作用 [J]. 中华血液学杂志,2001,22(5):238-40.
- [3] 陈苏宁,薛永权,张学光,等. 一株伴有 t(6;11)(q27;q23)和 p53 基因异常的人单核细胞白血病细胞系 SHI-1 的建立及鉴定 [J]. 中华血液学杂志,2005,26(2):94-9.
- [4] Liu J,Bi G,Wen P,et al. Down-regulation of CD44 contributes to the differentiation of HL-60 cells induced by ATRA or HMBA [J]. Cellular & Molecular Immunology,2007,4(1):59-63.
- [5] 张小雨,杨明珍. 高三尖杉酯碱对急性白血病 NB4 细胞凋亡机制的影响 [J]. 安徽医科大学学报,2011,46(9):879-82.
- [6] 陈苏宁,薛永权,吴亚芳,等. 人单核细胞白血病细胞系 SHI-1 的诱导分化和凋亡 [J]. 白血病淋巴瘤,2006,15(6):408-11.
- [7] Hildeman D A, Mitchell T, Teague T K,et al. Reactive oxygen species regulate activation-induced T-cell apoptosis [J]. Immunity, 1999, 10(6):735-44.
- [8] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apa-f1/caspase9 complex initiates an apoptotic protease cascade [J]. Cell, 1997, 91(4):479-89.
- [9] 刘佳宁,毕高峰,林汝湘,等. HL-60 细胞高三尖杉酯碱诱导后 CD44 表达变化及机制的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志,2008,15(18):1361-4.
- [10] 任艳玲,佟红艳. 高三尖杉酯碱联合 AG490 对 HEL 细胞 JAK2-STAT5 相关信号通路的影响 [J]. 中国实验血液学杂志,2011,19(5):1117-20.
- [11] Chen R, Guo L, Chen Y,et al. Homoharringtonine reduced Mcl-1 expression and induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood,2011,117(1):156-4.
- [12] Wang L, You L S, Ni W M,et al. β -Catenin and AKT are promising targets for combination therapy in acute myeloid leukemia [J]. Leuk Res,2013,37(10):1329-40.
- [13] Tong H, Ren Y, Zhang F,et al. Homoharringtonine affects the JAK2-STAT5 signal pathway through alteration of protein tyrosine kinase phosphorylation in acute myeloid leukemia cells [J]. Eur J Haematol,2008,81(4):259-66.
- [14] Yin S, Wang R, Zhou F,et al. Bcl-xl is a dominant antiapoptotic protein that inhibits homoharringtonine-induced apoptosis in leukemia cells [J]. Mol Pharmacol,2011,79(6):1072-83.

Inducing-apoptosis effect of homoharringtonine on acute monocytic leukemia cell line SHI-1 and its relevant mechanism

Zhao Yuchen, Yang Mingzhen

(Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the effect of homoharringtonine (HHT) on proliferation and induce apoptosis of acute monocytic leukemia cell line SHI-1, and whether the induction of apoptosis is mediated by mitochondrial apoptosis pathway. **Methods** Experiments were divided into control and test groups (5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/L}$). The growth inhibitory rate of SHI-1 cells was detected using Cell Counting Kit-8 (CCK-8) method, while the cell apoptotic rate was measured by AnnexinV-FITC/PI using flow cytometry. Mitochondrial membrane potential across the membrane ($\Delta\psi_m$) was determined by mitochondrial membrane potential assay kit with JC-1. **Results** HHT inhibited the growth of SHI-1 cells and induced apoptosis in concentration-dependent manners ($P < 0.05$). Mitochondrial

不同浓度葡萄糖对肺腺癌细胞 PEDF 表达的影响

金程¹, 束军¹, 姜志霞¹, 沈继龙²

摘要 目的 观察不同浓度葡萄糖对肺腺癌细胞株 A549 中色素上皮衍生因子(PEDF)表达的影响。方法 在基础培养液中,根据加入的葡萄糖浓度分为:对照组(5.6 mmol/L 葡萄糖)、甘露醇组(5.6 mmol/L 葡萄糖 + 25 mmol/L 甘露醇)、高糖 A 组(10 mmol/L 葡萄糖)、高糖 B 组(20 mmol/L 葡萄糖)、高糖 C 组(30 mmol/L 葡萄糖),进行 A549 细胞培养,分别于 24、48、96 h 后取样:采用半定量 RT-PCR 法检测不同时间点、含不同浓度葡萄糖组细胞 PEDF mRNA 水平,用 ELISA 法检测细胞培养上清液中和胞内 PEDF 蛋白,比较不同组间 PEDF 表达水平差异。结果 与对照组相比,随着葡萄糖浓度的增加,各组 A549 细胞 PEDF 的表达水平有明显下降趋势($P < 0.05$),呈剂量依赖性改变;随着葡萄糖作用时间的延长,除 RT-PCR 检测中的高糖 C 组,及 ELISA 检测中的高糖 B 组外,各组 A549 细胞 PEDF 的表达水平有明显下降趋势($P < 0.05$),呈时间依赖性改变。结论 高浓度葡萄糖、较长时间作用可能降低肺腺癌细胞 PEDF 的表达水平。

关键词 肺腺癌;色素上皮衍生因子;葡萄糖;浓度;影响

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)08-1084-04

色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是目前已知最强的内源性血管形成抑

制剂。研究^[1]表明, PEDF 在各种类型的肺癌细胞株中均有表达;有报道^[2]称, PEDF 在糖尿病性肾病中分泌降低,并且高血糖是其分泌下降的直接原因;另有报道^[3]称,糖尿病患者中肺癌的发病率远高于普通人群。由此推测较高血糖浓度可能对肺癌细胞的发生、发展产生影响,但相关研究尚未见报道。该实验拟通过体外条件下改变细胞培养液中葡萄糖的浓度,观察不同浓度的葡萄糖对肺腺癌细胞 PEDF 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 A549 细胞株由安徽医科大学附属省立医院检验科实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂及仪器 检测 PEDF mRNA 的 RT-PCR 引物购于生工生物(上海)有限公司;TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 第一链 cDNA 合成试剂盒购于德国 Thermo Scientific 公司;ELISA 试剂盒购于上海原叶公司;无糖型 1640 培养液、胎牛血清购于美国 Gibco 公司;葡萄糖购于美国 Sigma 公司;DNA Marker (DL2000) 购于日本 TaKaRa 公司。电热恒温水浴锅购于上海天平仪器厂;超速离心机购于德国 Beckman 公司;超净工作台购于苏州安泰空气技术有限公司;165-4000IEF 电泳仪购于美国 Bio-Rad 公司;D-801 凝胶成像分析系统购于江苏捷达科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 复苏 A549 细胞,用含 100 ml/L 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、5.6 mmol/L 葡萄糖的 1640 培养液培养于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 将无糖型 1640 培养液作为细胞

2014-04-02 接收

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(编号:1308085MH141);安徽高等学校省级自然科学研究重点项目(编号: KJ2011A173);安徽医科大学科研基金资助项目(编号: 2010xkj115);安徽医科大学第四附属医院引进人才科研启动基金资助项目

作者单位:¹安徽医科大学第四附属医院呼吸内科,合肥 230022

²安徽病原生物学省级实验室和人兽共患病安徽省重点实验室,安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室,合肥 230032

作者简介:金程,男,硕士研究生;

束军,男,医学博士,硕士生导师,责任作者, E-mail: J. Shu@126.com

membrane potential across the membrane analysis showed that SHI-1 cells significantly showed an alteration of fluorescence after treating with HHT for 20 hours, as compared with control group. **Conclusion** HHT is able to inhibit proliferation and induce apoptosis of SHI-1 cells, the mechanism may be associated with the mediation by mitochondrial apoptosis pathway.

Key words homoharringtonine; SHI-1 cell; acute monocytic leukemia; cell proliferation; cell apoptosis