

阿糖胞苷或柔红霉素与全反式维 A 酸的不同联用方式致体外 HL-60 凋亡差异

张 春¹, 陆晓彤¹, 陈敏玲², 张顺国², 王燕琼², 赵 薇², 张 健¹ (1. 上海交通大学医学院附属新华医院, 上海 200092; 2. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心, 上海 200127)

[摘要] 目的 研究阿糖胞苷 (cytarabine, Ara-C) 或柔红霉素 (daunorubicin, DNR) 与全反式维 A 酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 以不同方式联用, 体外作用于白血病细胞株 HL-60 导致细胞凋亡差异及可能机制。方法 体外培养 HL-60 细胞株, 细胞悬液以浓度 $2.0 \times 10^5 /m$ 接种后分 7 组, 分别为 A: 对照组; B: Ara-C 与 ATRA 同时联用 48 h 组, Ara-C+ ATRA 48 h; C: ATRA 与 Ara-C 先后联用 48 h 组, ATRA 24 h \rightarrow Ara-C 24 h; D: Ara-C 与 ATRA 先后联用 48 h 组, Ara-C 24 h \rightarrow ATRA 24 h; E: DNR 与 ATRA 同时联用 48 h 组, DNR+ ATRA 48 h; F: ATRA 与 DNR 先后联用 48 h 组, ATRA 24 h \rightarrow DNR 24 h; G: DNR 与 ATRA 先后联用 48 h 组, DNR 24 h \rightarrow ATRA 24 h。Ara-C、DNR、ATRA 给药浓度均为 1.0×10^{-7} mol/L。应用流式细胞仪、Western blotting 观察药物不同方式联用致 HL-60 细胞凋亡的差异及相关机制变化。结果 与 A 组相比, D 组 HL-60 细胞凋亡比例轻度增加 (50 \pm 14.7)%, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 消失; E 组和 G 组 HL-60 凋亡细胞明显增多, 其中 E 组能最大限度减少 HL-60 存活数量, 使 HL-60 细胞死亡数目增加, 达 (4.00 \pm 0.56)%; E、F、G 组抗凋亡蛋白 Bcl-2 均消失。结论 同时联用 DNR 与 ATRA 能显著减少 HL-60 细胞存活率, 两药的三种联用方式均可使抗凋亡蛋白 Bcl-2 消失。但是, 首先应用小剂量 Ara-C, 随后应用 ATRA 的联用方式可明显增多细胞凋亡数目, 抑制 HL-60 细胞的抗凋亡蛋白 Bcl-2 不能表达, 有效控制细胞凋亡方向, 是最有潜力的药物联用方式。

[关键词] 阿糖胞苷; 柔红霉素; 全反式维 A 酸; HL-60 联用; 凋亡; 抗凋亡蛋白

[中图分类号] R 965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)03-0262-04

Different administrations of combination cytarabine or daunorubicin with all-trans retinoic acid lead to variance of HL-60's apoptosis and respectively mechanism *in vitro*

ZHANG Chun¹, LU Xiaotong¹, CHEN Minling², ZHANG Shun-guo², WANG Yan-qiong², ZHAO Wei², ZHANG Jian¹ (1. Xinhua Hospital affiliated to Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200092, China; 2. Department of Pharmacy, Shanghai Children's Medical Center affiliated to Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200127, China)

[Abstract] **Objective** To investigate variance of apoptosis and correspondingly mechanism in HL-60 cell line *in vitro* by different combinations administration of three drug including cytarabine, daunorubicin and all-trans retinoic acid. **Methods** HL-60 cell line was cultured *in vitro*, cell suspension was divided into different 7 groups which's density was $2.0 \times 10^5 /m$: Group A: control; Group B: Ara-C and ATRA were simultaneous applied in cells for 48 h (Ara-C+ ATRA 48 h); Group C: ATRA and Ara-C subsequently administered respectively for 24 h that is ATRA was applied first for 24 h then followed by Ara-C for 24 h; Group D: Ara-C and ATRA subsequently administered respectively for 24 h that is Ara-C was applied first for 24 h then followed by ATRA for 24 h; Group E: DNR and ATRA simultaneously administered for 48 h; Group F: DNR and ATRA subsequently administered respectively for 24 h that is DNR was applied first for 24 h then followed by ATRA for 24 h; Group G: ATRA and DNR subsequently administered respectively for 24 h that is ATRA was applied first for 24 h then followed by DNR for 24 h. All drug concentrations of Ara-C, DNR and ATRA were 1.0×10^{-7} mol/L. The ratio of apoptosis cells was evaluated by flow cytometry. Antiapoptosis protein Bcl-2 was checked by Western Blotting. **Results** The ratio of cell apoptosis in D group increase slightly, the rate of increase in apoptosis was (50 \pm 14.7)%, its protein Bcl-2 disappeared. Compared with control group, both two groups including E and G groups caused the apoptosis ratio significant higher. The alive cells' ratio in E group was reduced to the highest degree and the amount of dead cells increased to a degree of (4.00 \pm 0.56)%. Antiapoptosis protein Bcl-2 in E, F, G groups all disappeared. **Conclusion** Combination DNR and ATRA simultaneously can effectively decrease HL-60 survival. Three ways of combination DNR with ATRA can significantly cause protein Bcl-2 disappear. But low dose of Ara-C was administered first then followed by ATRA can not only increase slightly the ratio of apoptosis of HL-60 cell but also inhibited

[作者简介] 张 春 (1977-), 女, 主管药师, 硕士, Tel 13918504669
E-mail: chun_zh@163.com

[通讯作者] 张 健. E-mail: zj_bos@126.com

the ratio of apoptosis of HL-60 cell but also inhibited

antiapoptosis protein Bcl2 to express and effectively controlled the way of HL-60 cells death to apoptosis and we concluded that this combination is the most potential way.

[Key words] cytarabine; daunorubicin; all-trans retinoic acid; HL-60; combination; apoptosis; antiapoptosis protein

化疗药物与细胞非毒性药物全反式维 A 酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 联用已被证实可提高急性早幼粒细胞性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 患者的无病生存率, 减低复发率。在此基础上, 有临床研究比较 ATRA 以不同顺序联用化疗药物: ATRA 与化疗同时进行或 ATRA 首先治疗 90 d 随后进行相同方案化疗, 结论认为后者可减少患者 2 年内的复发率, 说明 ATRA 先于化疗药物应用更有益^[1]。然而随后有研究跟踪以上两方案的长期疗效, 比较后认为无明显差异^[2]。由此可见 ATRA 如何与化疗药物联用是目前研究尚存争议之处, 且缺乏改变两类药物联用方式的体外研究。本研究培养人早幼粒白血病细胞株 HL-60 改变阿糖胞苷 (cytarabine, Ara-C) 或柔红霉素 (daunorubicin, DNR) 与 ATRA 的联用形式, 体外作用于 HL-60 观察药效, 拟阐明药物的不同联用方式是否会对体外培养的 HL-60 细胞产生疗效差异及相应的可能机制, 为临床药物选择与合理联用提供药理学实验资料。

1 材料与方 法

1.1 试剂及配制 Ara-C (0.1g 辉瑞公司, 批号: 678012-B 65G012)。DNR (20mg 法玛西亚普强 (中国) 有限公司, 批号: 5F1011-A)。Ara-C、DNR 以生理盐水溶解, 储存液浓度分别为 8.0×10^{-2} 、 7.09×10^{-3} mol/L; 工作液为 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} mol/L, -20℃分装保存备用。ATRA (Sigma 公司, 批号: 066K1044), 以无水乙醇溶解, 配成 1.0×10^{-2} mol/L 储存液, -20℃保存。以 1.0×10^{-3} mol/L 为工作液, -4℃保存待用。Annexin V-FITC 凋亡试剂盒 (美国 BD Biosciences 公司)。细胞裂解、蛋白抽提、蛋白浓度测定、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制等试剂盒、蛋白质分子量标准、Actin 抗体、Western 荧光检测的 BeyoECL Plus 试剂盒均来自碧云天生物技术公司。X 光压片为柯达公司产品。Bcl2 单克隆兔抗购自美国 Epitomics 公司。其他试剂包括: 1640 培养液 (杭州吉诺公司)。胎牛血清 (杭州四季清公司)。甘氨酸、吐温 20 乙醇等其它试剂均为实验用分析纯。

1.2 仪器 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Kendro 实验室: Revco 3000TVBB); Labconco II 生物净化柜; 流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司: Coulter Epics Altra); 恒温摇床 (华利达实验设备公司: HZ-8811K), 分光光

度计 (Eppendorf 公司: Biophotometer), 电泳仪 (江苏海门医用仪器厂: EEP102), 细胞培养瓶, 培养板等细胞培养用耗材均为 Coming 公司产品。

1.3 细胞培养及分组 HL-60 细胞株来自 ATCC, 购自中科院上海分院细胞库。将 HL-60 细胞悬浮培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养液, 于 37℃, 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。每隔 2~3 d 传代 1 次。取对数生长期细胞, 调整细胞悬液密度为 2.0×10^5 /ml 以药物不同联合作用方式分组处理细胞, 设置 7 组: A 组: 不加药的培养细胞 (对照组); B 组: Ara-C 与 ATRA 同时联合作用 48 h 组 (Ara-C + ATRA 48 h); C 组: ATRA 预先作用 24 h Ara-C 继续作用 24 h 组 (ATRA 24 h[→] Ara-C 24 h); D 组: Ara-C 预先作用 24 h, ATRA 继续作用 24 h 组 (Ara-C 24 h[→] ATRA 24 h); E 组: DNR 与 ATRA 同时联合作用 48 h 组 (DNR + ATRA 48 h); F 组: ATRA 预先作用 24 h, DNR 继续作用 24 h 组 (ATRA 24 h[→] DNR 24 h); G 组: DNR 预先作用 24 h, ATRA 继续作用 24 h 组 (DNR 24 h[→] ATRA 24 h)。给药过程中第 1 种药物作用 24 h 后, 以 1 000 r/min, 5 min 离心洗涤细胞悬液, 弃上清, 加第 2 种药物的含药培养液悬浮细胞, 轻轻吹散细胞, 继续培养 24 h。为保持实验条件一致, 对照组和两种药物同时联用组在实验处理 24 h 后与其他组同时离心洗涤, 然后以与第 1 个 24 h 相同含药培养液悬浮培养。

1.4 流式细胞凋亡分析 按 BD 公司试剂盒说明步骤进行: 以冰 PBS 洗涤细胞悬液, 调整细胞密度为 1.0×10^6 /ml 重悬于 100 μl 结合液中, 加入 5 μl Annexin V-FITC 及 5 μl PI 轻柔混悬细胞, 室温暗处反应 15 min, 加入结合液 400 μl 混悬后上机分析。同时设置未染色细胞, Annexin V-FITC 单染色及 PI 单染色为补偿分析。

1.5 细胞裂解及蛋白抽提 取 RIPA 裂解液, 在使用前 5 min 加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mM。充分裂解细胞, 10 000 g 离心, 取上清。

1.6 蛋白定量 以 BCA 法测定蛋白浓度, 标准曲线为 25~500 μg/ml 各样品加入工作液后于 37℃ 恒温摇床缓摇 30 min, 于 562 nm 处测定吸光度。每个样品均以 2 管平行管测定, 取均值。定量上样蛋白浓度为 0.73 mg/ml。

1.7 凋亡蛋白家族 Bcl2 蛋白的 Western Blotting 每 4 μl 蛋白样品加入 1 μl 上样缓冲液, 100℃加热

5 min, 使之充分变性, 冷却致室温后上样。以 12% 分离胶配制 SDS-PAGE 凝胶依次行垂直电泳、以 PVDF 膜行水平电泳后, 以 5% 脱脂牛奶封闭, 依次加入第一抗体, 4 °C 缓摇过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的小鼠二抗 (β-Actin) 及兔抗 (Bcl2), 室温缓摇 2 h, 4 °C TBST 漂洗, 发光 15 min。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 15.0 统计分析软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Student-t 检验。凋亡细胞升高幅度表示为: 凋亡细胞升高幅度百分数 = [(处理组凋亡细胞百分数 - 对照组凋亡细胞百分数) / 对照组凋亡细胞百分数] × 100%。

2 结果

2.1 流式细胞仪凋亡分析 Ara-C 与 ATRA 联用的各种方式, 与对照组相比凋亡细胞百分数均有升高趋势: 升高幅度最高的 B 组升高了 (99 ± 14.1) %, 其次为 D 组, 升高了 (50 ± 14.7) %, 达 (0.90 ± 0.14) %, C 组升高了 (42 ± 6.6) %, 达 (0.85 ± 0.07) %。DNR 与 ATRA 各种联用方式中 E 组与 G 组的凋亡百分数比对照组明显升高 (P < 0.05), 且 E 组比 G 组的凋亡百分数比亦明显升高 (P < 0.05) 具体见表 1。

表 1 阿糖胞苷、柔红霉素与全反式维 A 酸不同方式联用对 HL-60 细胞的凋亡作用 (% , $\bar{x} \pm s$ n = 4)

分组	凋亡率
A: Control	0.60 ± 0.01
B: Ara-C + ATRA 48h	1.20 ± 0.14
C: ATRA 24 h → Ara-C 24 h	0.85 ± 0.07
D: Ara-C 24 h → ATRA 24 h	0.90 ± 0.14
E: DNR + ATRA 48 h	4.00 ± 0.56 ¹⁾
F: ATRA 24 h → DNR 24 h	0.70 ± 0.14
G: DNR 24 h → ATRA 24 h	3.05 ± 0.49 ¹⁾

¹⁾ P < 0.05 与 A 组比较; ²⁾ P < 0.05 与 G 组比较。

2.2 凋亡蛋白家族 Bcl2 的 Western Blotting 分析

为了进一步研究 HL-60 细胞在不同药物联用方式下发生凋亡差异的可能机制, 本研究选取了凋亡家族中有较强代表性的抗凋亡蛋白 Bcl2 做 Western Blotting 分析, 如图 1 所示。Bcl2 蛋白在 A、B、C 组均强烈表达, 在 D、E、F、G 组均未表达, 显示阴性。从左至右分别为: A: Control; B: Ara-C + ATRA 48 h; C: ATRA 24 h → Ara-C 24 h; D: Ara-C 24 h → ATRA 24 h; E: DNR + ATRA 48 h; F: ATRA 24 h → DNR 24 h; G: DNR 24 h → ATRA 24 h。

3 讨论

化疗药物与 ATRA 的联用方式当前尚有不同观

点与方案, 主要有: ① ATRA 与急性粒细胞性白血病标准化疗方案联用, 包括蒽环类抗生素的标准诱导治疗及标准剂量的 Ara-C, 随后接 1~2 个巩固治疗^[3-7]; ② ATRA 仅与蒽环类药物联用以减小诱导治疗的压力, 随后接 3 个巩固疗程^[8,9]; ③ ATRA 单用数周, 观察其有无治疗作用, 从而以此预测化疗疗效, 再以 2 倍化疗剂量 (包括高剂量 Ara-C) 与 ATRA 联用^[10]。

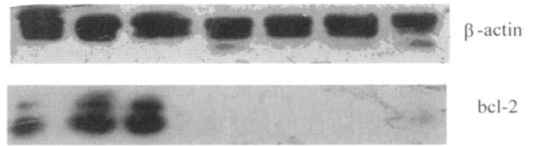


图 1 Ara-C 或 DNR 与 ATRA 以不同方式联合给药后的 HL-60 细胞中抗凋亡蛋白 bcl-2 的变化

本研究于体外培养 HL-60 将 Ara-C 与 ATRA 以不同方式联用, 改变两药联用顺序, 导致 HL-60 细胞凋亡百分数的差异及抗凋亡蛋白变化, 从实验条件证实了不同联用方式对 HL-60 凋亡存在不同意义。

在 Ara-C 与 ATRA 联用的条件下, HL-60 的凋亡率从高至低依次为: Ara-C 与 ATRA 同时联用, Ara-C 首先作用 24 h, ATRA 随后作用 24 h, ATRA 首先作用 24 h, Ara-C 随后作用 24 h 提示两药同时联用对增加细胞凋亡数较理想。而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的 Western blot 却显示只有 Ara-C 首先作用 24 h, ATRA 随后作用 24 h 的这种方式 Bcl-2 蛋白消失, 由此可有 2 种推测: 在这种药物作用方式下 HL-60 细胞启动了强大的凋亡机制将 Bcl-2 裂解, 从而大大削弱细胞的抗凋亡力量, 使之顺利进入凋亡程序; 或者在此种作用方式下 Bcl-2 根本无法表达, 即其表达受到了抑制, 从而不能行使抗凋亡功能。那么到底是“裂解”还是“抑制”? 结合流式细胞测试的结果: 凋亡细胞数 D 组升高幅度高于 C 组, 本文推测是药物的“抑制”起到了主导作用。Ara-C 是与体内核苷结构相似的抗代谢化疗药物, 属于细胞周期特异性药物, 主要抑制 S 期细胞的 DNA 复制; 同时还可使 S 期激活因子即细胞周期蛋白 A 和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶瞬时消失, 而这两种酶对 S 期 DNA 复制的启动有重要信号作用; 由此在 S 期与 DNA 复制有关的蛋白质酶类的合成就被完全阻断^[11]。此时编码 Bcl-2 的癌基因的表达则也可能在被抑制之列, 从而使起抗凋亡作用的 Bcl-2 蛋白不能表达。这与其它研究一致^[12]: 小剂量 Ara-C (10⁻⁸ mol/L) 组肿瘤细胞的 p53 蛋白、mRNA、bcl-2 mRNA

(下转第 273 页)

【参考文献】

[1] 中国药典 2005年版. 一部[S]. 2005: 32.
 [2] 金延明, 李胜华, 楼之岑. 中药大蓟和小蓟植物资源调查[J]. 中国中药杂志, 1994, 12: 23.
 [3] 王本祥. 现代中药药理学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1997: 783.
 [4] 张勉, 张朝凤, 王峥涛. 侧茎囊吾化学成分的研究[J]. 药理学学报, 2005, 40(6): 529.
 [5] 孙燕荣, 董俊兴, 吴曙光. 杜仲化学成分研究[J]. 中药材,

2004, 27(5): 341.
 [4] 张中朋, 杨中林, 唐登峰, 等. 地蚕化学成分分离与鉴定[J]. 中成药, 2004, 26(12): 1051.
 [7] 陆江海, 赵玉英, 乔梁, 等. 醉鱼草化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26: 41.
 [8] 张卫东, 陈万生, 王永红, 等. 灯盏花黄酮苷化学成分的研究[J]. 中草药, 2000, 31(8): 565.

[收稿日期] 2010-05-07

[修回日期] 2010-06-24

(上接第 264 页)

均随作用时间呈递减变化。还有报道当 10^{-6} mol/L 的 A ra-C 与一定剂量的喜树碱联合应用诱导急性早幼粒白血病细胞株 MOL T-4 4 h 细胞凋亡数目明显增加^[13], 且细胞多处于 G0 期, S 期细胞明显减少。因此推断正是这种抑制作用为随后 ATRA 的诱导分化作用铺平了道路, 除被阻断在 S 期的细胞外, ATRA 将诱导其它处于细胞周期阶段的细胞分化, 使之趋于衰老直至死亡。

当 ATRA 与 A ra-C 同时作用时, Bcl-2 反而表达, 推测有可能 DNA 复制阻断药物与诱导分化药物间发生了一定的拮抗, 使抗凋亡癌基因有机会表达。因此 A ra-C 在联合给药中的作用地位主要是对细胞周期的阻断。

ATRA 与 DNR 联用, 不论何种方式均可获得良好效果, 表现为细胞凋亡流式检测同时联用和 DNR 先用, ATRA 后用均可显著提高细胞凋亡数量, 而联用的三种方式均可使 Bcl-2 蛋白消失。推测这是因为 DNR 是对 G1 期细胞作用最强的抗癌抗生素。目前已知肿瘤细胞周期长于正常细胞主要在于其有较长的 G1 期^[11], DNR 强烈抑制 G1 期 RNA 和各种 DNA 转录启动蛋白的合成, 使之不能进入下一个细胞周期, 为 ATRA 的同时或后续诱导分化提供了良好的条件。

根据本研究结论推测首先应用小剂量 A ra-C 随后应用 ATRA 的联用方式可明显增多细胞凋亡数目, 抑制 HL-60 细胞的抗凋亡蛋白 Bcl-2 不能表达, 有效控制细胞凋亡方向, 是最有潜力的药物联用方式。

【参考文献】

[1] Laurent D, Zheng YW. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia[J]. Oncogene 2001, 20: 7140.
 [2] Martin SF, Jan et WA, Charles AS et al. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol[J]. Blood 2002, 100(13): 4298.
 [3] Tallan MS Andersen JW, Schiffer CA, et al. All trans retinoic

acid in acute promyelocytic leukemia[J]. N Engl J Med, 1997, 337: 1021.
 [4] Tallan MS, Andersen JW, Schiffer CA, et al. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol[J]. Blood 2002, 100: 4298.
 [5] Fenaux P, Le Deley MC, Castaigne S, et al. Effect of all-trans retinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of an multicenter randomized study[J]. Blood 1993, 82: 3241.
 [6] Fenaux P, Chastang C, Chevret S, et al. A randomized comparison of all-transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia[J]. Blood, 1999, 94: 1192.
 [7] Bumett AK, Grinwade D, Solomon E, et al. Presenting white blood cell counts and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: results of the randomized MRC trial[J]. Blood 1999, 93: 4131.
 [8] Aandelli F, Diviero D, Avvisati G, et al. Molecular remission in FML/RAR α -positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (IDA) therapy[J]. Blood 1999, 90: 1014.
 [9] Sanz MA, Martin G, Rayón C, et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed FML/RAR α -positive acute promyelocytic leukemia[J]. Blood 1999, 94: 3015.
 [10] Lengfelder E, Reichert A, Schoch C, et al. Effects in patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia[J]. Leukemia 2000, 14: 1362.
 [11] 陈仁彪, 孙岳平. 细胞与分子生物学基础[M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 147.
 [12] 杜冰, 朱道银, 唐恩洁. 小剂量阿糖胞苷体外诱导 HL-60 细胞凋亡的作用[J]. 重庆大学学报(自然科学版), 2004, 27: 145.
 [13] 喻春钊, 吴丰华, 余源, 等. Camptothecin (CPT) 和 Cytosine arabinoside (Ara-C) 联合应用对 MOL T-4 细胞株周期特异性凋亡的影响[J]. 肿瘤, 2004, 24: 349.

[收稿日期] 2009-12-11

[修回日期] 2010-01-11