

低浓度雷公藤甲素联合伊达比星诱导急性髓系白血病 干细胞凋亡及其机制

郑忠信, 柳约坚, 陈菲莉, 易正山, 董慧娟, 周 勇, 周淑芸, 徐 兵
(南方医科大学南方医院血液科, 广东 广州 510515)

摘要:【目的】探讨低浓度雷公藤甲素联合伊达比星(IDA)在体外对急性髓系白血病细胞(AML)干细胞凋亡的影响及其分子机制。【方法】应用流式细胞仪分选 KG1a 细胞中具有 AML 干细胞特性的 CD34⁺CD38⁻亚群;对分选的 CD34⁺CD38⁻KG-1 α 细胞进行免疫表型和细胞周期的测定;流式细胞术检测 IC₂₀ 浓度的雷公藤甲素、IC₅₀ 浓度的 IDA 单药及上述浓度的雷公藤甲素联合 IDA 对 CD34⁺CD38⁻KG1a 细胞的诱导凋亡作用;蛋白质印迹法检测药物处理后 HIF-1 α 及其下游 CXCR4、VLA-4 蛋白表达水平的变化。【结果】分选后 CD34⁺CD38⁻亚群细胞占 KG-1 α 细胞比例达(98.15 \pm 1.64)%, 细胞周期检测显示 G₀/G₁ 期细胞比例达(82.40 \pm 3.82)%。空白对照组、IC₂₀ 浓度的雷公藤甲素(5 nmol/L)单药组、IC₅₀ 浓度的 IDA(27nmol/L)单药组及上述浓度的雷公藤甲素联合 IDA 组作用于 AML 干细胞细胞,24 h 凋亡率分别为:(5.63 \pm 0.67)%、(9.11 \pm 0.33)%、(24.85 \pm 1.70)%和(76.87 \pm 8.34)%,联合组诱导 AML 干细胞凋亡比较显著高于雷公藤甲素单药组及 IDA 单药组(均 $P < 0.001$)。蛋白质印迹法结果显示单药组及联合组均可以不同程度下调 AML 干细胞 HIF-1 α 、CXCR4 及 VLA-4 蛋白的表达水平,其中联合组最为明显。【结论】低浓度雷公藤甲素可显著提高 IDA 对 AML 干细胞诱导凋亡作用,其机制可能是通过抑制 HIF-1 α 及其下游通路实现的。

关键词: AML 干细胞;雷公藤甲素;IDA; HIF-1 α

中图分类号: R733 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2014)05-0667-05

Low-dose Triptolide in Combination with Idarubicin Induce Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells Via Modulation of HIF-1 α Pathways

ZHENG Zhong-xin, LIU Yue-jian, CHEN Fei-li, YI Zheng-shan, DONG Hui-juan, ZHOU Yong,
ZHOU Shu-yun, XU Bing

(Department of Hematology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of low-dose triptolide (TRI) in combination with idarubicin (IDA) on acute myeloid leukemia stem cells and the relationship with HIF-1 α pathway. 【Methods】CD34⁺CD38⁻KG1a cells was sorted from KG1a cell lines by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Immunophenotype and cell cycle analysis of CD34⁺CD38⁻KG1a cells were analyzed by fluorescence-activated cell sorting analysis. Annexin-V/PI double staining was used to detect the effects of low-dose TRI in combination with IDA on apoptosis of CD34⁺CD38⁻KG1a cells. Western blotting to analyze the expression of HIF-1 α and its downstream protein CXCR4, VLA-4 in CD34⁺CD38⁻KG1a cells after treatment with TRI, IDA, and TRI+IDA. 【Results】After sorting, 98.15 \pm 1.64% of the cells were labeled for CD34⁺CD38⁻. Cell cycle analysis also showed that proportion of G₀/G₁ cells was 82.4 \pm 3.82%. CD34⁺CD38⁻KG1a cells were exposed to 5 nmol/L TPL, 27 nmol/L IDA and TRI+IDA for 24 h. The apoptotic cells were determined by PI/Annexin V staining and flow cytometric analysis. Apoptotic ratio of cells treated by IDA with TPL was significantly increased compared to cells treated by IDA alone (24.85 \pm 1.70% vs. 76.87 \pm 8.34%, $P < 0.001$). Western blot results showed markedly decrease the expression of HIF-1 α , CXCR4 and VLA-4 in CD34⁺CD38⁻KG1a cells treated with low-dose TRI in combination with IDA. 【Conclusion】A relatively low concentration of TPL in combination with IDA could induce apoptosis of AML stem cells in vitro via inhibition of HIF-1 α pathway.

Key words: triptolide (TRI); idarubicin (IDA); acute myeloid leukemia stem cells; HIF-1 α pathway

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(5):667-671]

收稿日期:2014-03-30

基金项目:国家自然科学基金(81070425)、广东省科技计划项目(2011B031800063)

作者简介:郑忠信,检验技师,研究方向:流式细胞术在血液肿瘤中应用,E-mail:zx232@126.com.* 通信作者:徐兵,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:血液肿瘤靶向治疗,E-mail:xubingzhangjian@126.com

急性髓细胞性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一种造血干细胞的恶性克隆性疾病。目前研究表明 AML 干细胞是 AML 起源及难治复发的关键。AML 干细胞具有自我更新能力以及无限再殖潜力,且多处在 G_0/G_1 期的静止状态,同时高表达 MDR1、MRP 等耐药相关蛋白,对化疗药物耐药^[1]。因此,寻找针对 AML 干细胞的治疗药物是 AML 最根本的治疗策略。雷公藤甲素是一种来源于中草药植物雷公藤的二萜类化合物,体内外实验已经证实了其具有较强的抗白血病活性,但由于其治疗剂量与毒性剂量较接近导致雷公藤甲素在临床应用十分受限。我们前期实验结果表明,低浓度 (IC_{20}) 的雷公藤甲素能够增强一些化疗药物的抗肿瘤作用,提示低浓度雷公藤甲素可作为化疗增敏药^[2]。伊达比星 (Idarubicin, IDA) 是一种治疗 AML 的有效化疗药物,既往在体外实验研究中已经证实了 IDA 能够部分克服 P-糖蛋白介导的多药耐药现象^[3]。本研究探讨低浓度 (IC_{20}) 的雷公藤甲素能否提高 IDA 诱导 AML 干细胞凋亡的作用,并进一步探讨其分子机制。

1 材料与方 法

1.1 药物和试剂

雷公藤甲素购自 Sigma 英国公司,IDA 购自美国辉瑞公司日本分公司,IMDM 培养基、Stempro-34 和胎牛血清培养基购自美国 Gibco 公司, FITC 标记小鼠抗人 CD34 单克隆抗体、PE 标记小鼠抗人 CD38 单克隆抗体、PE 标记小鼠抗人 CD117 单克隆抗体、FITC 标记小鼠抗人 CD123 单克隆抗体、APC 标记小鼠抗人 CD90 单克隆抗体购于 BD 美国公司, AnnexinV/FITC 凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物发展有限公司, RIPA 裂解液购于碧云天公司, HIF-1 α 及 CXCR4 单抗购自 Cell Signaling technology 公司, VLA-4 单抗购自 Santa Cruz Biotechnology 公司, GAPDH 单抗购自杭州贤至生物有限公司, 羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗购自中杉北京金桥公司。

1.2 细胞培养及分选

将人 AML 细胞株 KG-1 α 细胞株 (购自天津血液病研究所) 置于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基中, 取对数期生长细胞应用 CD34-FITC、CD38-PE 和 Anti-FITC 分别标记 KG-1 α , 使用流

式细胞仪分选出 CD34+CD38-KG-1 α 细胞, 使用 Stempro-34 无血清培养基添加 rhIL-3、rhIL-6、rhSCF、rhFlt3、rhG-CSF 等细胞因子培养。

1.3 分选 CD34+CD38-KG-1 α 细胞免疫表型测定

使用一系列 CD38-FITC、CD117-PE、CD123-FITC、CD90-APC 单克隆抗体对从 KG-1 α 细胞株中分选出的 CD34+CD38⁻ 细胞表面进行流式细胞仪免疫表型检测。

1.4 分选 CD34+CD38-KG-1 α 细胞的细胞周期检测

使用碘化丙啶染料试剂盒通过流式细胞仪检测 CD34+CD38-KG-1 α 细胞的细胞周期情况。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

采用 Annexin V/PI 双染色流式细胞术检测选取 IC_{20} 浓度的雷公藤甲素 (5 nmol/L)、 IC_{50} 浓度的 IDA (27 nmol/L) 单药及上述浓度的雷公藤甲素联合 IDA 作用于 CD34+CD38-KG-1 α 细胞 24 h 后, 流式细胞仪分析细胞凋亡比例。

1.6 蛋白质印迹法检测

选择 IC_{20} 浓度的雷公藤甲素 (5 nmol/L)、 IC_{50} 浓度的 IDA (27 nmol/L) 单药及上述浓度的雷公藤甲素联合 IDA 作用 CD34+CD38-KG1 α 细胞后, 按我室建立的方法^[4]检测 HIF-1 α 、CXCR4 及 VLA-4 蛋白表达水平的变化。

1.7 统计分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 两组间均数的比较使用独立样本 t 检验方法; 多组间均数比较使用单因素方差分析方法进行统计, 在方差分析显著的情况下使用 Bonferroni (方差齐性) 进行多重比较; 若方差不齐则采用近似 F 检验 (如 Welch 方法) 后采用 Dunnett T3 方法进行多重比较; 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准为 $\alpha = 0.05$, 双侧检验。

2 结 果

2.1 分选 CD34+CD38-KG1 α 的 AML 干细胞模型的建立及细胞周期鉴定

对 KG-1 α 细胞进行小鼠抗人 CD34-FITC、CD38-PE 双抗体标记后, 在流式细胞仪进行分选, CD34+CD38⁻ 亚群细胞占 KG-1 α 细胞比例为从 $(53.24 \pm 2.11)\%$ 上升到 $(98.15 \pm 1.64)\%$, ($t=33.11$, $P < 0.001$); 而细胞周期检测显示, CD34+CD38⁻ 细

胞中 G₀/G₁ 期细胞占(82.40 ± 3.82)% (图 1)。

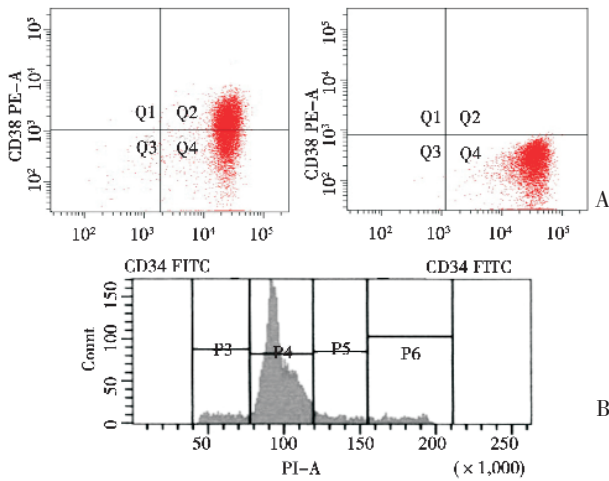


图 1 KG-1 α 中分选出 CD34⁺CD38⁻AML 干细胞的检测结果

Fig.1 The detect results of CD34⁺CD38⁻ AML stem cells sorted from KG1 α cell line

A: Expressions of CD34 and CD38 in KG1 α cells before (left) and after (right) sorting; B: Cell cycle analysis of CD34⁺CD38⁻ KG1 α cells.

2.2 CD34⁺CD38⁻KG-1 α 的表面抗原检测鉴定

流式细胞仪检测分选后的 CD34⁺CD38⁻ KG-1 α 细胞的表面抗原显示 CD117⁺ CD38⁻细胞比例为(95.8 ± 3.1)%, 而 CD123⁺CD90⁻的细胞比例为(97.4 ± 1.2)%, 提示流式细胞仪分选出的具有 CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺/CD90⁻免疫表型, 符合 AML 干细胞的免疫表型(图 2)。

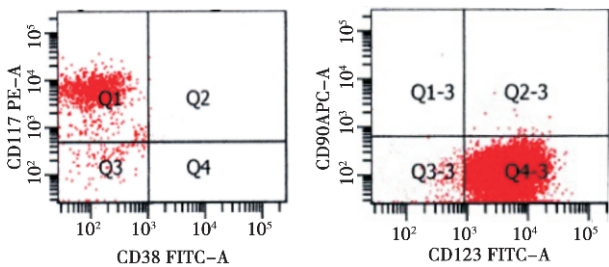


图 2 分选后 CD34⁺CD38⁻KG1 α 细胞的表型流式细胞仪检测结果

Fig.2 Flow cytometry of CD34⁺CD38⁻KG1 α cells after choose

2.3 小剂量雷公藤甲素增强 IDA 对 AML 干细胞的诱导凋亡作用

空白对照组、IC₂₀ 浓度的雷公藤甲素(5 nmol/

L)单药组、IC₅₀ 浓度的 IDA(27 nmol/L)单药组及上述浓度的雷公藤甲素联合 IDA 组作用于 AML 干细胞细胞 24 h 后凋亡比例分别为:(5.63 ± 0.67)%、(9.11 ± 0.33)%、(24.85 ± 1.70)%和(76.87 ± 8.34)%(图 3、4)。统计分析显示 4 个处理组方差分析结果存在统计学差异 ($F=120.8, P < 0.001$); 雷公藤甲素单药组及 IDA 单药组处理后 AML 干细胞的凋亡细胞比率均比对照组升高(雷公藤甲素单药组 vs 对照组 $t = 6.551, P = 0.0028$, IDA 单药组 vs 对照组 $t = 19.26, P < 0.001$); 联合组较雷公藤甲素单药组及 IDA 单药的凋亡比率相差 10.8-17.0 倍, 差异有统计学意义(雷公藤甲素单药组 vs 联合组 $t = 11.47, P < 0.001$; IDA 单药组 vs 联合组 $t = 8.72, P < 0.001$)。

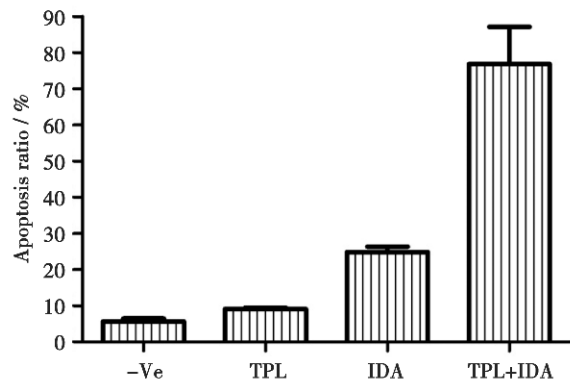


图 3 不同治疗组处理 AML 干细胞后细胞凋亡比例直方图
Fig.3 Histogram of apoptotic ratio in AML stem cells exposed to different treatments

2.4 Western blotting 检测 HIF-1 α 、CXCR4 及 VLA-4 蛋白表达水平变化

5 nmol/L 雷公藤甲素单药、27 nmol/L 的 IDA 单药及上述浓度的雷公藤甲素联合 IDA 作用于 AML 干细胞 24 h 后, 以 western blotting 方法检测细胞内 HIF-1 α 、CXCR4 及 VLA-4 蛋白的表达水平, 结果发现, 用药组及联合组较之对照组均有不同程度的下调, 其中双药组对 HIF-1 α 、CXCR4 及 VLA-4 蛋白的表达水平下调最为明显(图 5、6)。

3 讨论

研究发现 AML 干细胞在 AML 耐药中起着核心作用, 是导致 AML 治疗失败的根本原因, 目前认为标准的化疗, 甚至致死剂量的造血干细胞移

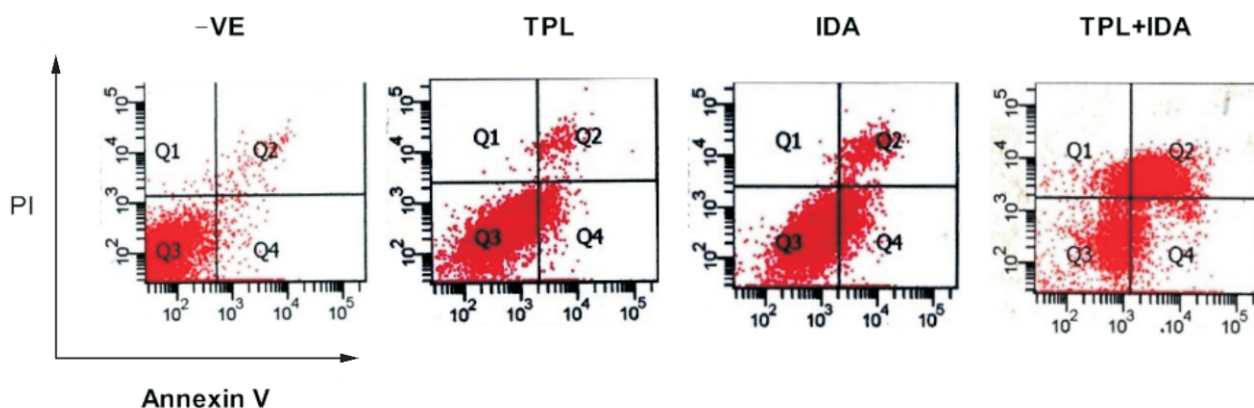


图 4 不同治疗组处理 AML 干细胞后细胞凋亡比例

Fig.4 AML stem cells were exposed to different treatments with apoptotic ratio detected using flow cytometry

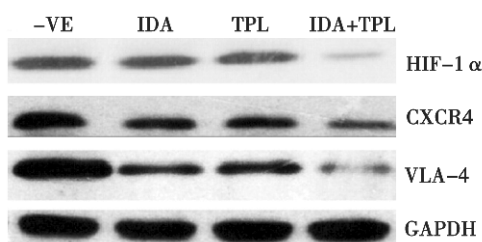


图 5 Western blotting 检测不同治疗组处理 AML 干细胞后 HIF-1 α 、CXCR4、VLA-4 蛋白表达水平。

Fig.5 Western blotting analysis of the expression of HIF-1 α , CXCR4 and VLA-4 in the AML stem cells exposed to different treatments

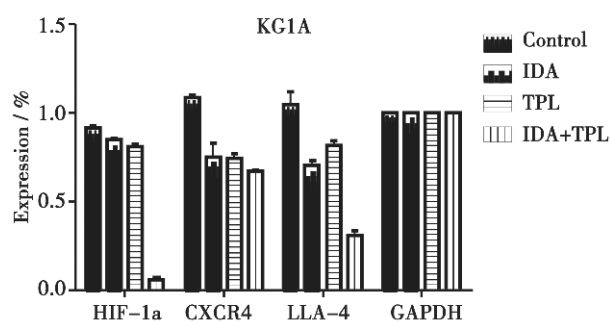


图 6 不同治疗组处理 AML 干细胞后 HIF-1 α 、CXCR4、VLA-4 蛋白表达水平变化的直方图。

Fig.6 Histogram of the expression of HIF-1 α , CXCR4 and VLA-4 in the AML stem cells exposed to different treatments

植的预处理也难以完全杀灭 AML 干细胞,未被清除的 AML 干细胞最终导致患者复发,寻找有效杀伤 AML 干细胞的方法是十分重要^[1]。筛选杀伤 AML 干细胞药物的难点之一是很难获得足够研究

的 AML 干细胞,常规方法是从白血病患者体内提取 AML 干细胞,但受到量及许多方面的制约。国外研究表明 KG-1 α 细胞系来源于男性 AML-M0 病人,其高表达 P 糖蛋白,对常规 AML 化疗药物耐药。且该细胞系 98% 表达 CD34,90% 表达 CD123,多数不表达 CD38,与目前公认 AML 干细胞的免疫表型特征相一致。近年来国内外学者已有不少文献报道从 KG-1 α 细胞中分选 CD34⁺CD38⁻细胞作为 AML 干细胞进行相应的研究^[5-6]。本研究结果也表明分选 CD34⁺CD38⁻KG-1 α 细胞大部分均处于 G₀/G₁ 期、表达 CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺/CD90⁻免疫表型,符合 AML 干细胞的特征。

雷公藤甲素能有效地抑制 K562、HL-60 等白血病细胞株的增殖和凋亡^[7],研究还发现雷公藤甲素还具有清除静止期的 CD34⁺慢性髓系白血病干祖细胞的能力^[8-9]。但雷公藤甲素的临床应用依然十分受限,其原因是其治疗剂量与毒性剂量较接近。本研究结果表明表明了低浓度雷公藤甲素能够增强伊达比星对 AML 干细胞的诱导凋亡作用。流式细胞术分析发现联合组与伊达比星单药组相比,AML 干细胞凋亡比例明显升高[(76.87 ± 8.34)% vs (24.85 ± 1.70)% , $P < 0.001$]。由于我们采用是对 AML 干细胞无明显增殖抑制作用的 IC₂₀ 浓度,远未达到治疗剂量,因此,理论上该浓度雷公藤甲素安全性相对较好。雷公藤甲素毒性作用主要消化系统、泌尿系统、生殖系统、循环系统,而 IDA 主要毒性作用是骨髓抑制,结合本研究所采用雷公藤甲素的浓度仅为 IC₂₀,理论上雷公藤甲素联合 IDA 并不会明显增加 IDA 的毒性作用。

白血病微环境因素介导的白血病细胞耐药性

愈来愈引起人们的重视,AML 干细胞通过龕(niche)内的信号通路调控处于被保护阶段,从而导致了细胞耐药性的增加,对支持 AML 干细胞的微环境进行靶向干扰是可以诱导 AML 干细胞凋亡^[10]。既往的研究表明,AML 干细胞相对于其他的造血干细胞而言生存在一个相对缺氧的环境中,而缺氧诱导因子-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 α ,HIF-1 α)介导了细胞内的缺氧反应,具有促进处在低氧状态的骨髓微环境中的 AML 干细胞更好的存活并增殖的能力^[11-12]。研究表明 AML 干细胞NF- κ B 通路是持续激活,是 AML 干细胞靶向治疗重要靶点。研究发现 NF- κ B 可与 HIF-1 α 的启动子基因相结合,相互促进其转录及相互激活^[13-14]。因此,下调 HIF-1 α 可间接影响 NF- κ B 通路,从而通过细胞信号网络进一步产生级联反应诱导 AML 干细胞凋亡。本研究显示低浓度雷公藤甲素联合 IDA 作用 AML 干细胞后 HIF-1 α 及其下游基因 CXC 趋化因子受体 4(C-X-C chemokine receptor type 4,CXCR4)和极慢抗原-4(very late antigen4,VLA-4)的蛋白表达明显下调,表明了低浓度雷公藤甲素联合 IDA 可通过抑制 AML 干细胞中 HIF-1 α 及其下游通路诱导 AML 干细胞凋亡。

总之,本研究初步结果显示 IC₂₀ 浓度雷公藤甲素在体外能显著提高伊达比星对 AML 干细胞的诱导凋亡作用,有望提高临床疗效,减少患者复发的机会,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Horton SJ, Huntly BJ. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology[J]. *Haematologica*, 2012, 97(7): 966-974.
- [2] Xu B, Guo X, Mathew S, et al. Triptolide simultaneously induces reactive oxygen species, inhibits NF- κ B activity and sensitises 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines[J]. *Cancer letters*, 2010, 291(2): 200-208.
- [3] Fukushima T, Inoue H, Takemura H, et al. Idarubicin and idarubicinol are less affected by topoisomerase II-related multidrug resistance than is daunorubicin [J]. *Leuk Res*, 1998, 22(7): 625-629.
- [4] 王相滕,陈菲莉,柳约坚,等.雷公藤甲素体外逆转急性髓系白血病耐药性[J].*白血病·淋巴瘤*, 2013, 22(9):542-547.
Wang XM, Chen FL, Liu YJ, et al. Triptolide reverse
- drug resistance of adriamycin resistant acute myeloid leukemia cells Via inhibition of HIF-1 α pathway [J]. *J Leukemia & Lymphoma*, 2013, 22(9):542-547.
- [5] She M, Niu X, Chen X, et al. Resistance of leukemic stem-like cells in AML cell line KG1 α to natural killer cell-mediated cytotoxicity[J]. *Cancer Lett*, 2012, 318(2): 173-179.
- [6] Fardel O, Payen L, Courtois A, et al. Differential expression and activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein in CD34-positive KG1 α leukemic cells[J]. *Int J Oncol*, 1998, 12(2): 315-319.
- [7] Meng HT, Zhu L, Ni WM, et al. Triptolide inhibits the proliferation of cells from lymphocytic leukemic cell lines in association with downregulation of NF-kappaB activity and miR-16-1*[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(4): 503-511.
- [8] Li H, Hui L, Xu W, et al. Triptolide modulates the sensitivity of K562/A02 cells to adriamycin by regulating miR-21 expression[J]. *Pharm Biol*, 2012, 50(10): 1233-1240.
- [9] Mak DH, Wang RY, Schober WD, et al. Activation of apoptosis signaling eliminates CD34+ progenitor cells in blast crisis CML independent of response to tyrosine kinase inhibitors[J]. *Leukemia*, 2011, 26(4): 788-794.
- [10] Huang MM, Zhu J. The regulation of normal and leukemic hematopoietic stem cells by niches[J]. *Cancer Microenviron*, 2012, 5(3): 295-305.
- [11] Mucaj V, Shay JE, Simon MC. Effects of hypoxia and HIFs on cancer metabolism[J]. *Int J Hematol*, 2012, 95(5): 464-470.
- [12] Deeb G, Vaughan MM, McInnis I, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α protein expression is associated with poor survival in normal karyotype adult acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia Research*, 2011, 35(5): 579-584.
- [13] Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, et al, Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(12): 4691-4697.
- [14] Scortegagna M, Cataisson C, Martin RJ, et al. HIF-1 α regulates epithelial inflammation by cell autonomous NFkappaB activation and paracrine stromal remodeling[J]. *Blood*, 2008, 111(7): 3343-3354.

(编辑 孙慧兰)