

鬼臼噻吩甙、高温联用体外诱导白血病细胞 HL-60 的凋亡及净化

童秀珍¹, 洪文德¹, 罗绍凯¹, 龚素珍², 彭爱华¹

(中山医科大学 1. 附属第一医院血液科, 2. 生理教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨高温联用鬼臼噻吩甙(Vm-26)诱导白血病细胞的凋亡及净化。【方法】13例急性白血病骨髓、15例正常骨髓和10例HL-60细胞株用形态学、DNA凝胶电泳、流式细胞仪及半固体集落培养技术,观察42℃60min高温或联用鬼臼噻吩甙(Vm-26)诱导HL-60细胞的凋亡及其体外净化白血病细胞的效果。【结果】①HL-60细胞经42℃60min、42℃60min+8.5μmol/L Vm-26处理后48h流式细胞检测的凋亡细胞(sub-G₁%)达高峰,分别为76.4%±7.8%、93.4%±3.6%, $P<0.05$ 。DNA凝胶电泳24~48h处理后出现典型的梯状图谱,而对于正常骨髓细胞经上述同样处理后sub-G₁分别为18.6%±5.1%、40.1%±3.2%(与HL-60细胞比较 $P<0.01$)。②高温42℃60min联用Vm-26体外净化白血病细胞集落(L-CFU)、HL-60的抑制率分别为99.2%±1.8%、100%。而正常粒巨噬细胞集落(GM-CFU)的抑制率为49.5%±4.5%。【结论】高温42℃60min联用Vm-26诱导HL-60细胞的凋亡比对正常造血细胞的凋亡强,高温联用Vm-26是一种较好的体外净化方法。

关键词: 白血病/治疗; 鬼臼噻吩甙/治疗应用; 凋亡

中图分类号: R 733.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2000)01-0040-03

Apoptosis of Leukemic HL-60 Cells Induced by the Combination of Hyperthermia and Vm-26 and Purging of the Leukemic Cells *in Vitro*

TONG Xiu-zhen¹, HONG Wen-de¹, LUO Shao-Kai¹, GONG SU-zhen², PENG Ai-hua¹

(Sun Yat-sen University of Medical Sciences 1. Department of Hematology, First Affiliated Hospital
2. Department of Physiology, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the differences in apoptosis between normal hematopoietic cells and leukemic cell line induced by combination of hyperthermia(HT) and Vm-26 and purging of the leukemia cells *in vitro*. 【Method】The bone marrow cells of 13 cases acute leukemia, 15 cases healthy people and 10 cases HL-60, it was observed the percentage of apoptosis cells respectively by using morphological method, flow cytometry analysis and DNA electrophoresis as well as the *in vitro* purging efficiency, using colony-forming cell culture. 【Results】① When cells were incubated 42℃60min alone or combined 42℃60min with Vm-26 for 48h, Sub-G₁% of HL-60 was 76.4%±7.8%, 93.4%±3.6%, respectively ($P<0.01$). Sub-G₁% of GM-CFU was 18.6%±5.1%, 40.1%±3.2%, respectively (vs HL-60, $P<0.01$). DNA from HL-60 cells showed ladder form. ② After treatment with 42℃60min plus Vm-26 (8.5μmol/L), inhibition rate was 99.2%±1.8% for L-CFU, 100% for HL-60, 49.5%±4.5% for GM-CFU. The HL-60 cells could be purged while the normal survived. 【Conclusion】The effect of Vm-26 plus 42℃60min induced apoptosis on HL-60 were stronger than those on normal hematopoietic cells. The combination of HT and Vm-26 was a good purging protocol of ABMT.

Key words: leukemia/therapy; teniposide/therapeutic use; apoptosis

高温诱导实体瘤细胞凋亡的作用已引起人们 的重视^[1], 鬼臼噻吩甙(Vm-26)属广谱的抗肿瘤药

收稿日期: 1999-03-02

作者简介: 童秀珍(1965-), 女, 江西玉山县人, 在职博士, 主治医师。

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物,临床上用于治疗急性白血病显示一定的疗效。我们用形态学观察、DNA 琼脂糖凝胶电泳和流式细胞仪、造血细胞集落培养技术等方法探讨高温联用 Vm-26 是否具有协同诱导白血病细胞的凋亡,以及其对自身骨髓移植体外净化的效果。

1 材料与方 法

1.1 标本来源

正常骨髓 15 例,取自非恶性血液病患者手术切除的肋骨。13 例初治的急性白血病患者,急性淋巴细胞性白血病 5 例,急性非淋巴细胞性白血病 8 例。HL-60 细胞株由中山医科大学临床药理教研室提供。

1.2 细胞培养

按本实验室常规抽取骨髓 2 mL 制作单个核细胞悬液, RPMI 1640 液洗涤 2 次,调细胞浓度为 $(1 \sim 2) \times 10^6 / \text{mL}$, 正常骨髓细胞、白血病细胞, HL-60 细胞株均经 42°C 水浴箱孵育 1 h, 或 Vm-26 $8.5 \mu\text{mol/L}$ 42°C 孵育 1 h, 对照组为 37°C 水浴 1 h。处理后的细胞分别进行半固体集落细胞培养, 液体继续培养 3、6、12、24、48 h 收获细胞用于 DNA 提取, 流式细胞仪检查。

1.3 形态学观察

培养细胞经苏木精染色, 油镜下计数凋亡细胞数(特点为细胞皱缩、染色质凝聚成深蓝色、胞核固缩断裂、胞膜仍完整), 计数 200 个细胞中凋亡细胞百分比(Apo%)。

1.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳

按参考文献[2]的方法, 取 2×10^6 个正常骨髓细胞或 HL-60 细胞, 用常规氯仿/酚法抽提 0、6、12、24 及 48 h 的细胞 DNA, 溶于 $1 \times \text{TE}$ (盐酸缓冲液)液中, 取 $10 \mu\text{L}$ 作 0.2 g/mL 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

1.5 流式细胞仪检测^[3]

取 1×10^6 细胞, 经冷乙醇固定后, 加入 RNA 酶, 室温放置 30 min, 加入碘化丙啶后上机。细胞发生凋亡后, 流式细胞仪可检测到在 G_1 期前出现 1 个峰, 计数凋亡细胞百分比(Sub-G%)。

1.6 模拟缓解期骨髓的体外净化

将正常骨髓单个核细胞(MNC)与 HL-60 细胞按 10 : 1, 100 : 1 比例进行混合, Vm-26 浓度分别为 $0.85 \mu\text{mol/L}$, $4.25 \mu\text{mol/L}$, $8.5 \mu\text{mol/L}$, 经 42°C 水浴

60 min 进行集落培养。

1.7 甲基纤维素半固体培养

白血病祖细胞细胞集落(L-CFU)及正常骨髓粒细胞集落(GM-CFU)按本实验常规方法进行。

1.8 统计学处理

采用 *t* 检验, 方差检验。

2 结 果

2.1 单用 42°C 60min 或联用 Vm-26 诱导白血病细胞的凋亡

HL-60 细胞经单独 42°C 60 min 处理后 6 h 开始出现凋亡细胞, 48 h 达高峰, 凝胶电泳 24 ~ 48 h 出现典型梯状图谱, 形态学观察 Apo%、流式细胞仪检测凋亡细胞 Sub- G_1 % 分别为 $78.1\% \pm 5.6\%$, $76.4\% \pm 7.8\%$ 。而联用 Vm-26 $8.5 \mu\text{mol/L}$ 处理后, HL-60 细胞的凋亡有增加的趋势, 其 Apo%、Sub- G_1 % 分别为 $92.1\% \pm 4.8\%$, $93.4\% \pm 3.6\%$ (与单独高温相比, $P < 0.05$)。凝胶电泳 12 ~ 24 h 发现典型梯状图谱。

2.2 单用 42°C 60 min 或联用 Vm-26 诱导正常骨髓细胞的凋亡

正常骨髓细胞经单独 42°C 60 min 处理后 48 h 仍未见有典型梯状图谱, 其 Apo%、Sub- G_1 % 分别为 $19.4\% \pm 4.2\%$, $18.6\% \pm 5.1\%$ 。联用 Vm-26 处理后, 凋亡细胞 Apo%、Sub- G_1 % 分别为 $38.4\% \pm 3.6\%$, $40.1\% \pm 3.2\%$ (明显低于 HL-60 细胞, $P < 0.01$)。

2.3 42°C 1 h 联用 Vm-26 对 L-CFU 和 HL-60 的作用

不同浓度 Vm-26 联用高温 42°C 1 h 比单纯高温能更有效地杀伤 HL-60、L-CFU 而较少增加对正常骨髓造血细胞的抑制作用。如 42°C 60 min 联用 Vm-26 $8.5 \mu\text{mol/L}$ 处理后, L-CFU、HL-60 抑制率分别为 $99.2\% \pm 1.8\%$ 、100%。而 GM-CFU 的存活率为 $50.2\% \pm 4.1\%$, (见图 1)。

2.4 42°C 联用 Vm-26 对模拟缓解期骨髓的体外净化

本实验使用联合法对模拟微量 HL-60 细胞的骨髓细胞进行体外净化。结果如图 2 显示: 当正常骨髓单个核细胞与 HL-60 细胞比例为 10 : 1 时, 由于未净化, HL-60 细胞比例较高, CFU-GM 存活受到一定的抑制, 净化处理后, HL-60 细胞绝大多数被

杀伤,而 CFU-GM 可恢复到未净化之前的 2 倍。当 MNC:HL-60 细胞比例为 100:1,CFU-GM 受到 HL-60 细胞抑制较少,经净化处理后 HL-60 细胞存活为 0,CFU-GM 有 49.5% 存活(与 HL-60 比较, $P < 0.05$)。

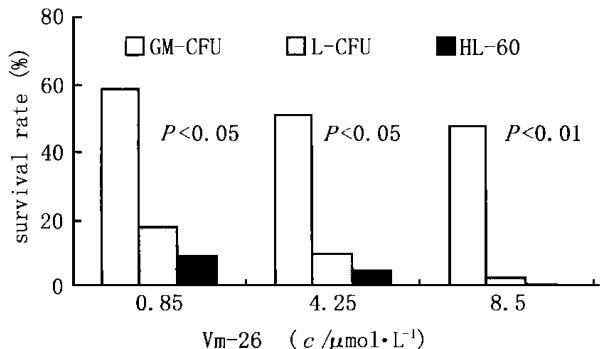


图 1 42 °C 60 min 联用 Vm-26 对 GM-CFU、L-CFU、HL-60 集落存活率的影响

Fig. 1 Effect on the survival rate of GM-CFU, L-CFU, HL-60 by colony the combination of Vm-26 and 42 °C 60 min

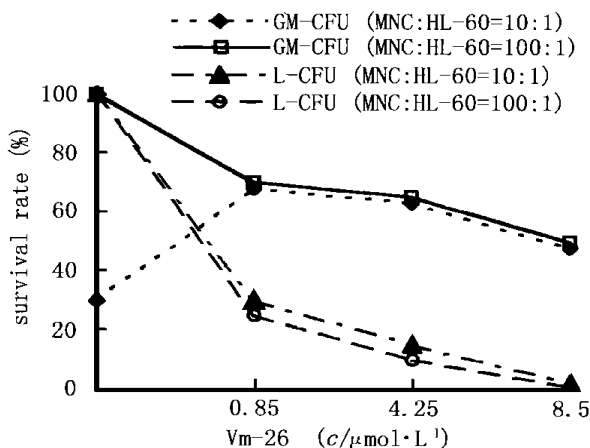


图 2 42 °C 60 min 联用 Vm-26 对模拟缓解期骨髓集落存活率的影响

Fig. 2 Effect on the survival rate of simulating remission bone marrow cells colony by the combination of Vm-26 and 42 °C 60 min

3 讨论

高温在一定范围内可诱导肿瘤细胞的凋亡,正常造血细胞超过 43 °C 则会引起细胞坏死^[2]。有作者提出高温可与其它诱导肿瘤细胞凋亡的因素如抗癌药物、细胞因子等联合应用^[3],但高温与哪些抗癌药物具有协同诱导白血病细胞凋亡,如何提高高温对肿瘤细胞的凋亡作用而又不增加对正常造

血细胞的凋亡,这些是需要我们研究的课题^[3]。有研究显示槲皮素(querceetin)能协助高温抑制 HSP-70 的表达,因而具有协同诱导白血病细胞凋亡的增加。我们发现高温对白血病细胞及正常造血细胞诱导凋亡存在差异。高温联用化疗药物 Vm-26 能增加对白血病细胞的诱导凋亡作用,而对正常造血组织细胞的诱导凋亡作用增加较少。HL-60 细胞及正常骨髓细胞经 42 °C 1 h 加 Vm-26 (8.5 μmol/L) 处理后 48 h, Sub-G₁% 分别为 93.4% ± 3.6%, 40.1% ± 3.2% 两者比较有显著差异性, $P < 0.01$ 。HL-60 细胞经处理后 24~48 h 出现典型梯状图谱。有作者研究高温引起肿瘤细胞发生的凋亡与热休克蛋白(HSP-70)有关^[4]。Vm-26 与高温具有协同诱导 HL-60 凋亡的机制,有待进一步研究。

本实验进行了高温联用 Vm-26 模拟体外净化白血病细胞的观察,经 42 °C 1 h 加 8.5 μmol/L Vm-26 处理后,L-CFU、HL-60 的抑制率分别为 99.2% ± 1.8%、100%。而 GM-CFU 的仍存活为 50.2% ± 4.1%,有明显的差异性。对模拟缓解期骨髓的研究提示,消灭残留白血病细胞,既达到清除净化的目的,又保持了正常造血细胞的活力,为临床上自伴骨髓移植进行体外净化提供了实验依据。

参考文献:

[1] Kerr J F R, Winterford G M, Hamon B V, *et al*. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy[J]. *Cancer*, 1994, 73(8): 2013

[2] Lisheng W, Chutse W, Xuetao P, *et al*. Purgig effect of dbutyl phthalate on leukemic cells[J]. *Leuk Res*, 1996, 20 (11- 12): 989

[3] Honma T. Characteristic of hyperthermia-induced apoptotic cell death[J]. *Nippon Rinsho*, 1996, 54(7): 1949

[4] Shchepotin I B, Soldatenkov V, Wroblenski J T, *et al*. Apoptosis induced by HT and verapamil in a human colon cancer cell line[J]. *Int J Hyperthermia*, 1997, 13(5): 547

[5] Iarocca LM, Ranelietti F O, Maggiano N, *et al*. Differential sensitivity of hyperthermia and quercetin used in combination: role of heat shock protein 70[J]. *Int J Cancer*, 1997, 173 (1): 75

(编辑 黄小延)