

维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡的研究^①

林桂真 黄仁魏 梁宁宁 唐如明 夏忠军 鲁 联

(中山医科大学附属第三医院血液病研究室; 广州, 510630)

摘要 目的:观察维甲酸(RA)在体外诱导 HL-60 细胞(人早幼粒细胞白血病细胞株)凋亡的作用,探讨维甲酸治疗早幼粒细胞白血病的作用机制。**方法:**用 DNA 电泳、DNA 片段定量测定技术、流式细胞术分析及光镜和电镜观察凋亡细胞。**结果:**在体外培养中加维甲酸 50 mg/L 孵育 4 h, DNA 片段率达 55.7%±12.1%,而对照为 12.5%±4.9% ($P < 0.001$, $n = 9$);流式细胞术检测发现,在 50 mg/L 维甲酸作用下,细胞凋亡达 50%,对照为 9%。电镜观察维甲酸组 HL-60 细胞出现典型的凋亡细胞形态改变。维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡具有剂量及时间依赖性,维甲酸作用 6 h,出现凋亡高峰;随维甲酸浓度升高,诱导凋亡作用明显增强。在环孢素 A(CsA)存在时,低浓度的维甲酸也有明显诱导 HL-60 细胞凋亡作用。**结论:**维甲酸在体外能诱导 HL-60 细胞凋亡,CsA 能增强维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡活性。研究提示诱导白血病细胞凋亡是维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病的重要机制之一。

关键词 HL-60 细胞^②; 白血病细胞; 细胞凋亡/药物作用; 维甲酸/副作用

中图分类号 R 375.35

The Study of Retinoic Acid Induces Apoptosis in HL-60 Cells

Lin Guizheng Huang Renwei Liang Ningning
Tang Jiaming Xia Zhongjun Lu Lian

(Department of Hematology of the 3rd Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of
Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Abstract Objective: To observe the effect of inducing apoptosis in promyelocytic leukemia cell line HL-60 cells by retinoic acid(RA) for investigating the mechanism of RA in treatment of promyelocytic leukemia. **Methods:** Apoptosis was detected with quantitation of DNA fragmentation, agarose gel electrophoresis of DNA ladder, flowcytometric analysis and morphological examination of apoptotic cells. **Results:** When HL-60 cells were incubated with RA 50 mg/L for 4 h, DNA fragmentation was 55.7%±12.1% as compared to 12.5%±4.9% with the control ($P < 0.001$). Flowcytometric analysis showed that apoptotic cells amounted to 50%, while control was only 9%. Examination with electron microscopy showed typical morphological change of apoptosis in HL-60 cells induced by RA. Induced apoptosis in HL-60 cells by RA was dose and time-dependent that showed when the cells were incubated with RA for 6h, it induced higher DNA fragmentation, and when the concentration of RA increased it expressed stronger activity in induced apoptosis. At the same time cyclosporine A was found to enhance apoptosis in HL-60 cells induced by RA. **Conclusion:** RA can induce apoptosis in HL-60 cells in vitro, and cyclosporine A can boosted up apoptosis induced by RA. This implies that inducing apoptosis in leukemia cell may be the important role of RA in the treatment of promyelocytic leukemia.

Subject headings HL-60 cell; leukemia; apoptosis/drug effects; retinoic/adverse effects

近年临床上已广泛应用维甲酸(retinoic acid, RA)治疗急性早幼粒细胞白血病(ANLL-M³)。以

往认为维甲酸治疗 M³ 是由于维甲酸诱导 M³ 细胞分化的结果^[1],但维甲酸是否还可通过其它途径

杀伤白血病细胞而达到治疗作用,有待进一步探讨。本研究在体外 HL-60 细胞培养中加入维甲酸,观察维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡作用,同时观察环孢素 A 对维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡的调节作用。

1 材料与方 法

1.1 试 剂

维甲酸(RA)购于四川重庆华邦制药有限公司,用 $\varphi = 2\%$ 吐温 80 和 3 蒸水配成溶液;环孢素 A(CsA),购于瑞士 Sandoz 公司。

1.2 细胞凋亡的诱导

HL-60 细胞以含 $\varphi = 15\%$ 小牛血清的 RPMI1640 培养液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\varphi = 5\%$ CO_2 、100%湿度常规培养,每周换液 2 次。取对数生长的细胞,以 RPMI 1640 洗涤 1 次,调整细胞密度为 $10^9/\text{L}$,接种于 24 孔培养板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\varphi = 5\%$ CO_2 、100%湿度培养,实验组分别加:RA、CsA,培养不同时间,收集细胞进行分析。

1.2.1 维甲酸诱导凋亡的量效反应 在 HL-60 细胞培养体系中加入维甲酸 0、10、20、50、100 mg/L,孵育 4 h,收集细胞分别测定 DNA 片段率及 DNA 电泳观察。

1.2.2 维甲酸诱导凋亡的时效反应 在培养体系中加入维甲酸 25 mg/L,分别孵育 0、2、4、6、8 h,收集细胞,分别测定 DNA 片段率及 DNA 电泳观察。

1.2.3 CsA 对维甲酸诱导凋亡的调节作用 在维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡的培养中,加入 CsA,孵育 4 h,收集细胞测定 DNA 片段率及 DNA 电泳观察,以单用维甲酸组为对照。

1.3 细胞凋亡的检测

1.3.1 DNA 电泳 按培养时间分别收集细胞,常规提取 DNA,用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,100 V,90 min,紫外光下观察 DNA 梯样条带并摄影。

1.3.2 DNA 片段率测定 按 Huang 氏报告的方法测定 DNA 片段率^[2]。DNA 片段率计算公式:

$$\frac{\text{上清液 A 值}}{\text{上清液 A 值} + \text{沉淀液 A 值}} \times 100\%$$

1.3.3 细胞形态观察 收集凋亡诱导的细胞,作涂片。经瑞氏染色观察细胞形态。同时用戊二醛固定细胞送电子显微镜观察。

1.3.4 流式细胞仪检测 收集经诱导培养后的细胞,用 PBS 洗涤,加入 $\varphi = 70\%$ 乙醇固定送检,观察 DNA 亚二倍体细胞率(凋亡细胞)。

2 结 果

2.1 维甲酸诱导 HL-60 细胞 DNA 片段化及形态学观察

$10^9/\text{L}$ HL-60 细胞加维甲酸 50 mg/L,经培养 4 h,明显可见细胞出现凋亡。定量测定 DNA 片段率,实验组为 $55.7\% \pm 12.1\%$,空白对照为 $12.5\% \pm 4.9\%$ ($P < 0.001$, $n = 9$);电镜检查可见细胞经孵育 6 h,核染色质明显固缩,胞浆呈撕裂状,出现空泡,可见出芽、凋亡小体等(图 1)。光镜检查发现 HL-60 细胞加入维甲酸 4h 后出现空泡,核开始固缩,染色质凝聚。

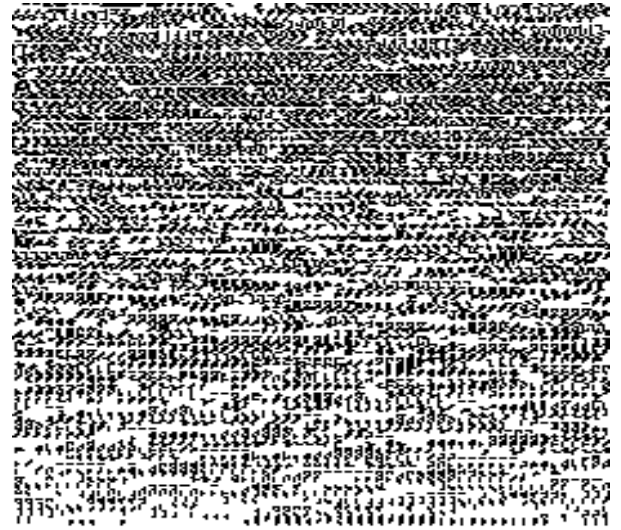


图 1 维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡形态学观察(透射电镜,6 000 \times)

Fig.1 Morphological observation for apoptotic cells induced by RA with electron microscopy examination(6 000 \times)

流式细胞术检测发现 HL-60 细胞在 50 mg/L 维甲酸作用下孵育 4 h 出现明显的凋亡细胞峰,凋亡率达 50%,而对照组细胞仅为 9%(图 2)。DNA 电泳可见典型的 DNA 梯样条带(图 3)。

2.2 维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡的量效反应

体外 HL-60 细胞培养加维甲酸 0~100 mg/L 孵育 4 h,在维甲酸浓度为 10 mg/L 时,DNA 片段率开始明显增多,达 $25.8\% \pm 8.3\%$,而对照组仅为 $12.5\% \pm 4.9\%$,两者比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$, $n = 10$),之后随维甲酸浓度增加 DNA 片段率不断增高,在维甲酸浓度为 50 mg/L 时 DNA 片段率达 $55.7\% \pm 12.1\%$;15g/L 琼脂糖凝胶做 DNA 电泳检查,可见随维甲酸浓度升高,DNA 梯样条带越明显,如图 3 所示。

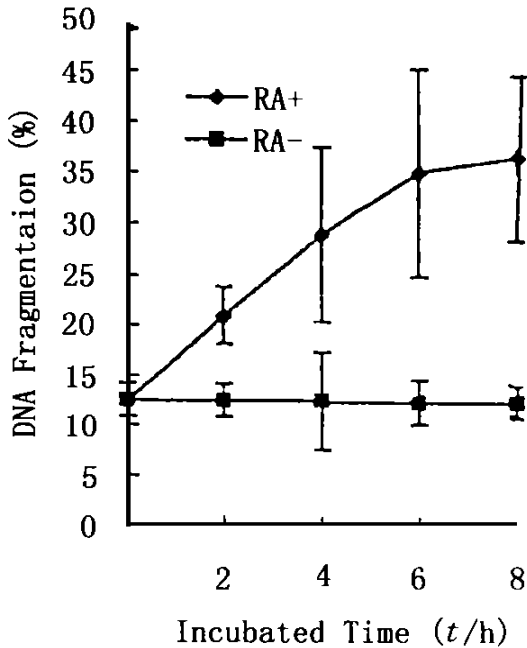


图2 流式细胞仪观察维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡
Fig.2 Examination of apoptosis in HL-60 cells induced by RA with Flowcytometric analysis

A: Control; without RA; B: Incubated with RA 50mg/L for 4h. It showed that apoptotic cell were up to 50%

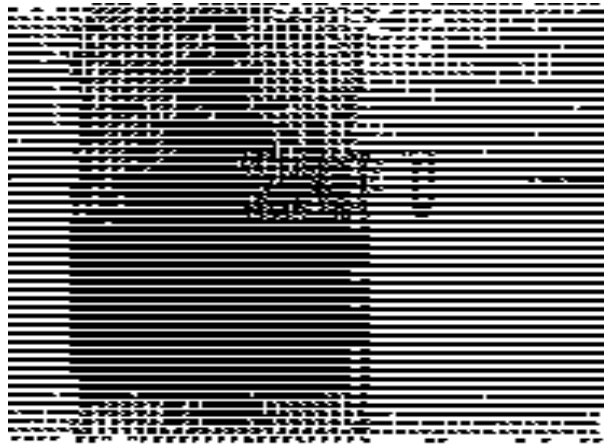


图3 DNA 电泳观察维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡的剂量反应

Fig.3 DNA electrophoresis examination for Dose-dependent reaction of induced-apoptosis in HL-60 cells with RA 1.1 kb DNA marker; 2. Control; 3~6. The concentration of RA was 10, 20, 50 and 100 mg/L

2.3 维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡的时效反应

在 HL-60 细胞体外培养中加维甲酸 25 mg/L, 经孵育 2~8 h, 可见随孵育时间延长 DNA 片段率增加。加维甲酸孵育 2 h DNA 片段率开始增

高, 经孵育 4 h, DNA 片段率增高至 28.8% ± 5.8%, 与空白对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$, $n = 10$), 经孵育 8 h, DNA 片段率达 35.4% ± 5.3% (图 4)。DNA 凝胶电泳可见随维甲酸使用时间延长 DNA 梯样条带越清晰。

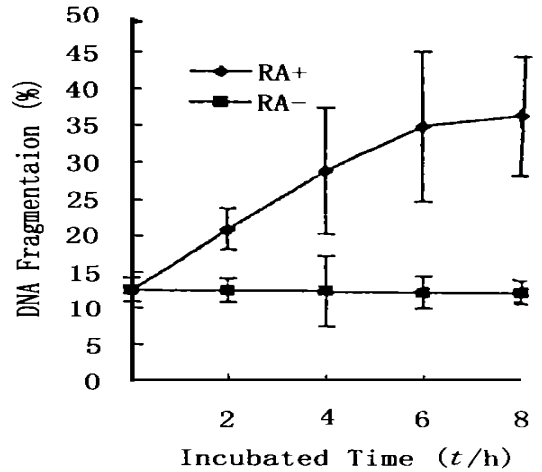


图4 DNA 片段化观察维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡的时效反应

Fig.4 Quantitation of DNA fragmentation for time-dependent reaction of induced-apoptosis in HL-60 cells by RA

2.4 CsA 在维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡中的上调作用

在 HL-60 细胞体外培养加维甲酸诱导细胞凋亡作用的同时, 加入 CsA, 可见 CsA 能增强维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡活性。单用维甲酸 25 mg/L 时, DNA 片段率为 25.6% ± 8.2%, 同时加 CsA 10 mg/L 时, DNA 片段率增高到 54.8% ± 9.6%, 两组比较有非常显著性差异 ($P < 0.001$), 而单用 CsA 10 mg/L, DNA 片段率与空白组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。同时在 CsA 存在时, 低浓度维甲酸 (10 mg/L) 也能明显诱导 HL-60 细胞出现凋亡。

3 讨论

以往认为维甲酸治疗 M3 是由于其诱导 M3 细胞分化, 减慢肿瘤细胞的增殖速度^[3]。但维甲酸治疗 M3 是否存在其它机制, 本研究进行了一些探讨。在早幼粒细胞白血病细胞株 (HL-60 细胞) 体外培养中, 加入维甲酸 50 mg/L 孵育 6 h, 发现细胞出现核固缩、染色质凝聚, 胞浆见空泡, 有凋亡小体

(下转第 68 页)

本研究显示,在中国广东一工厂健康体检发现的 19 例 ALT 升高者中,有 2 例成功扩增出 TTV DNA 的片段。进一步分析显示从这 2 例扩增出来的 DNA 片段其序列高度同源,同源性达 98.2%。目前 GenBank 中保存的 TTV DNA 序列中根据同源性不同主要有 Takahashi 等的 AB 011494 和 AB 011493,以及 Okamoto 等的 AB 008394 两个主要类型,两者的同源性仅为 89.2%。中国广东检出的 TTV DNA 片段与 AB 011494 和 AB 011493 高度同源,同源性为 98.7%。而与 AB 008394 相比,同源性仅为 89.2%。提示中国广东流行的 TTV 可能在基因型方法与 Takahashi 等的分离株相近。因而,在中国设计 TTV 的 PCR 引物时宜以 Takahashi 等分离株为标准。然而,仍存在 2 个碱基上的细微差别。其中,一个碱基变异导致密码子错义,出现精氨酸取代丝氨酸。这种差异的意义需进一步研究。

在健康体检人群中常可检出一些无症状 ALT 升高者,其中部分原因不明。本研究显示,HBV 感染是健康体检人群中 ALT 升高的主要原因。2 例

TTV DNA 阳性的 ALT 升高者均重叠 HBV 现症感染。因而,TTV 的致病性可能较弱或需要其他因素协同致病。

参 考 文 献

- 1 Shiffman M L, Luktic V A, Sanyal A J, *et al* · Hepatic lidocaine metabolism and liver histology in patients with chronic hepatitis and cirrhosis · *Hepatology*, 1994, 19(4):933
- 2 Czaja A J, Carpenter H A, Santrach P J, *et al* · The nature and prognosis of severe cryptogenic chronic active hepatitis · *Gastroenterol*, 1993, 104(6):1755
- 3 Karayiannis P, Brind A M, Pichering J, *et al* · Hepatitis G virus does not cause significant liver disease after liver transplantation · *J Viral Hepat*, 1998, 5(1):35
- 4 Guilera M, Saiz J C, Lopez L F X, *et al* · Hepatitis G virus infection in chronic liver disease · *Gut*, 1998, 42(1):107
- 5 Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, *et al* · A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology · *Biochem Biophys Res Com*, 1997, 241(1):92

(1998 - 06 - 19 收稿 1998 - 09 - 15 修回)

(上接第 52 页)

形成等形态学改变, DNA 出现片段化, DNA 电泳见到明显的梯样条带, 流式细胞仪检查发现亚二倍细胞明显增加。结果显示维甲酸诱导了 HL-60 细胞出现凋亡, 并存在时间效应关系和剂量效应关系。这提示, 维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡可能是其治疗早幼粒细胞白血病的重要机制之一。

难治病例的白血病细胞存在多药耐药性 (Multidrug Resistance, MDR), 常使治疗失败。临床曾用环孢素 A (CsA) 联合化疗治疗耐药、复发的急性白血病, 取得良好的疗效^[4,5], 但其作用机制仍不很清楚。近年发现某些药物对维甲酸诱导白血病细胞凋亡有正性调节作用。Wallington 等在体外研究发现, 在 1,25-双羟 D3 作用下, 维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡活性明显较单用维甲酸强^[6]。本研究在体外维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡培养中同时加入 CsA 10 mg/L, 维甲酸诱导 HL-60 细胞凋亡的活性明显增强, 而且在环孢素 A 存在时, 低浓度维甲酸也有明显诱导 HL-60 细胞凋亡的作用。提示环孢素 A 与维甲酸具有协同作用, 对维甲酸诱导白血病细胞凋亡有上调作用, 应用维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病时合用 CsA, 可能会取得更好疗效。

参 考 文 献

- 1 孙关林, 欧阳仁荣, 陈赛娟, 等 · 全反式维甲酸诱导分化治疗急性早幼粒细胞白血病 5 年研究总结 · *中华肿瘤杂志*, 1993, 15(2):125
- 2 Huang R W, Tsuda H, Takatsuki K · Interleukin-2 prevents programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells · *Int J Hematol*, 1993, 58(1):83
- 3 Preisler H D, Gopaly V · Regrowth resistance in leukemia and lymphoma: the need for a new system to classify treatment failure and for new approaches to treatment · *Leuk Res*, 1994, 18(3):149
- 4 赵春亭, 卞寿庚, 杨纯正, 等 · 环孢素 A 逆转急性髓细胞白血病多药耐药一例 · *中华血液学杂志*, 1995, 16(7):347
- 5 李晓明, 吴谨绪, 张连生, 等 · 环孢素 A 逆转难治性白血病多药耐药的临床研究 · *中华血液学杂志*, 1997, 18(2):73
- 6 Wallington L A, Bunce C M, Durham J, *et al* · Particular combinations of signals, by retinoic acid and 1 alpha, 25 dihydroxyvitamin D3, promote apoptosis of HL-60 cells · *Leukemia*, 1995, 9(7):1185

(1998 - 06 - 23 收稿 1998 - 10 - 21 修回)