

· 论 著 ·

西罗莫司抑制急性髓系白血病细胞株 Kasumi-1 增殖的研究

柳光芬¹, 曹柯林²

(1. 重庆消防总队医院检验科 400060; 2. 武警学院医院内科, 河北廊坊 065000)

摘要:目的 探讨不同浓度西罗莫司对急性髓系白血病细胞株 Kasumi-1 增殖、凋亡和细胞周期的影响。方法 MTT 法检测西罗莫司对 Kasumi-1 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测西罗莫司对 Kasumi-1 细胞凋亡和细胞周期的变化, 免疫荧光法观察西罗莫司处理前后 Kasumi-1 细胞核形态变化。结果 不同浓度的西罗莫司均能抑制 Kasumi-1 细胞的增殖, 促进其凋亡, 并使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期。Kasumi-1 细胞对西罗莫司表现为剂量依赖性, 并在 100 ng/mL 左右达到最大效应。结论 西罗莫司能够显著抑制 Kasumi-1 细胞增殖, 并对凋亡起促进作用。

关键词:西罗莫司; 白血病, 髓样, 急性; Kasumi-1 细胞株

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.012

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)14-1556-02

Sirolimus suppresses proliferation of human leukemia cell line kasumi-1

Liu Guangfen¹, Cao Kelin²

(1. Clinical Laboratory, Fire Brigade Hospital, Chongqing 400060, China;

2. Department of Internal Medicine, Armored Police Hospital, Hebei 065000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of different concentrations (0, 1, 10, 100, 200 ng/mL) of sirolimus on human leukemia cell line Kasumi-1. **Methods** Cell proliferation was detected by MTT assay, cell cycle and apoptosis were specially measured by flow cytometry. Changes of nucleus were observed under the microscope by staining with DAPI. **Results** Compared with the control group, Kasumi-1 cell line showed significantly growth inhibition and apoptosis in a concentration-dependent manner, and reached its maximal effect with 100 ng/mL concentrations. **Conclusion** The results showed that sirolimus inhibits proliferation and stimulates apoptosis of Kasumi-1 cell line.

Key words: sirolimus; leukemia, myeloid, acute; Kasumi-1 cell line

急性髓系白血病 (AML) 是成年人常见的一种急性白血病, 目前, AML 采用造血干细胞移植 (HSCT) 作为其治疗手段。HSCT 术后需要长期服用免疫抑制剂, 但目前常使用的强效免疫抑制剂可能损害自身机体免疫功能, 增加肿瘤发生率。因此, 需要一种既能够抑制机体免疫功能, 又能够有效防止肿瘤发生的临床药物以提高患者的生存率。

西罗莫司 (sirolimus) 又名雷帕霉素 (rapamycin), 是一种大环内酯类免疫抑制剂。1975 年首次作为一种低毒药物进行抗真菌治疗, 1989 年开始应用于器官移植术后的抗排斥反应。近年来, 西罗莫司逐渐用于抗肿瘤治疗, 有临床研究表明, 该药对非小细胞性肾细胞癌、乳腺癌等有治疗作用^[1-3]。同时也有实验证实, 西罗莫司能够抑制多种肿瘤细胞株的增殖, 并导致细胞凋亡的发生。

本研究使用不同浓度的西罗莫司处理 AML 细胞株 Kasumi-1, 观察其对细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响, 以探索西罗莫司在白血病治疗中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 AML 细胞株 Kasumi-1 购自上海细胞所。接种于含 10% 胎牛血清 (四季青)、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中 (Hyclone, 美国), 于 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度的培养箱中开放培养。每隔 3 d 传代 1 次, 收集对数生长期细胞备用。

1.2 方 法

1.2.1 MTT 法 取对数生长期的 Kasumi-1 细胞, 磷酸盐缓

冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 0.125% 胰酶消化后, 重悬于 RPMI-1640 培养基中, 细胞密度为 5 × 10⁴ 个/毫升。100 微升/孔接种于 96 孔培养板中。接种 8 h 后, 分别用 0.1、1、10、100、200 ng/mL 的西罗莫司处理细胞, 对照组加 100 μL 和西罗莫司对应浓度的含二甲亚砜 (DMSO) 的培养基, 纯培养基作为空白对照, 每组设 5 个复孔。于 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度开放培养。48 h 后吸去培养基, 每孔加入 20 μL 的 MTT (5 mg/mL, Sigma, 美国) 和 80 μL 的新鲜培养基, 继续培养 4 h 后吸去上层培养基, 每孔加入 100 μL 的 DMSO, 置于摇床上避光摇动 12 min, 待全部结晶完全溶解后, 酶标仪 495 nm 波长下测定吸光度值, 实验组和对照组吸光度值均减去对应的空白对照组吸光度值, 以消除本底值。实验重复 3 次后以平均值绘制出增殖曲线。

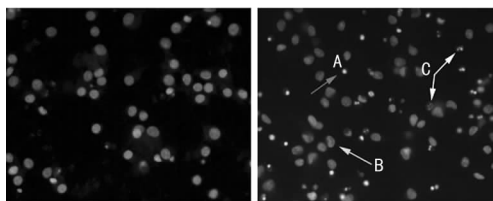
1.2.2 流式细胞检测技术 取对数生长期的细胞, PBS 清洗 2 次, 0.125% 胰酶消化收集细胞并重悬于 PBS 中, 细胞浓度为 1 × 10⁵ 个/毫升。再用 600 r/min 离心 5 min, 弃上清液。将收集到的细胞用 4 °C 的 75% 乙醇固定后送检。与 MTT 法相同分组。各取 1 mL 细胞悬液, 600 r/min 离心 4 min, 弃上清液, 再加入 1 mL PBS 重复洗涤 3 次。然后将细胞重悬于 200 μL 结合缓冲液中, 按照流式细胞周期分析试剂盒说明加入 5 μL Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂 (BD, 美国), 轻轻混匀, 于室温避光 15 ~ 20 min, 再加入 200 μL 结合缓冲液, 30 min 内用流式细胞仪检测细胞的周期和凋亡率, 每组实验重复 3 次。

1.2.3 免疫荧光法 细胞传代 24 h 后,实验组加入 100 ng/mL 西罗莫司处理 48 h,不加药物组作为空白对照。取对数生长期的细胞,PBS 清洗 2 次,0.125%胰酶消化收集细胞并重悬于 PBS 中,细胞浓度为 1×10^5 个/毫升。取 50 μ L 悬液加入细胞甩片机中制备细胞甩片,0.1%多聚甲醛固定 30 min 后 PBS 洗 5 min。在制好的玻片上滴加 2~3 滴 DAPI 染液,染色 10 min 后洗去染液,用滤纸吸去多余水分,甘油封片。置于荧光显微镜下观察,照相。

1.3 统计学处理 所有计量数据都以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据均使用 Excel 软件处理。

2 结 果

2.1 西罗莫司处理后细胞凋亡情况 Kasumi-1 细胞免疫荧光显示,和对照组相比,100 ng/mL 西罗莫司处理细胞 48 h 后,细胞核形态多不规则,可见死亡细胞,其细胞核皱缩为明亮小点,凋亡早期细胞核质呈新月形聚集于核膜一边,凋亡晚期细胞可见核碎裂即凋亡小体。显示细胞状态较差,死亡和凋亡的细胞明显增多,见图 1。



左:对照组,正常细胞核形态大小基本一致,染色均匀;右:实验组,细胞核多发生皱缩,破裂等情况。A:已经死亡的细胞;B:凋亡早期细胞;C:凋亡晚期细胞。

图 1 实验组和对照组细胞核凋亡情况(DAPI 染色, $\times 400$)

2.2 西罗莫司处理后细胞增殖率 MTT 法结果显示,和对照组相比,不同浓度的西罗莫司均能够抑制 Kasumi-1 细胞增殖 ($P < 0.05$),在 0.1~100 ng/mL 区间表现为剂量依赖性,随给药剂量的增加,细胞增殖率逐渐降低。但 100 ng/mL 和 200 ng/mL 的增殖抑制率差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明 100 ng/mL 左右的西罗莫司对 AML 细胞株 Kasumi-1 的影响达到了最大效应,见图 2。

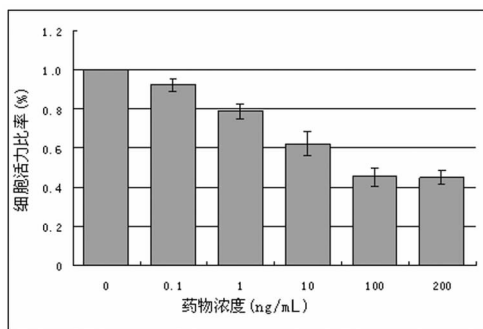


图 2 各浓度西罗莫司处理后, Kasumi-1 细胞的增殖率变化情况

2.3 西罗莫司处理后细胞凋亡率和细胞周期的变化 流式细胞仪检测细胞凋亡率显示,不同浓度的西罗莫司对 Kasumi-1 细胞的凋亡率都有影响。在 0.1~100 ng/mL 的浓度区间内,细胞凋亡率表现为剂量依赖性,随着给药剂量的增加凋亡率明显增加。但 100 ng/mL 和 200 ng/mL 组的细胞凋亡率差异无

统计学意义 ($P > 0.05$)。流式细胞仪检测细胞周期显示,不同浓度的西罗莫司对 Kasumi-1 细胞的周期都有影响。和对照组相比,实验组的 G_0/G_1 期细胞数明显增加,S 期细胞数明显减少,并表现为药物依赖性,但 100 ng/mL 和 200 ng/mL 组的各期细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3。

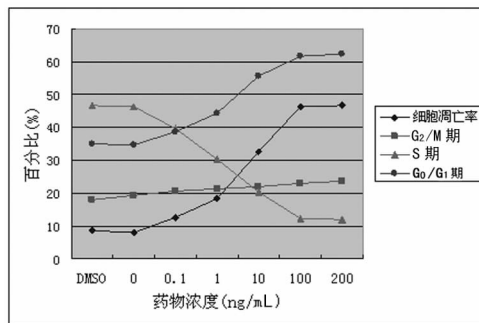


图 3 流式细胞仪检测各浓度西罗莫司处理后, Kasumi-1 细胞凋亡率和各周期变化情况

3 讨 论

急性白血病的发生、发展是一个多步骤、多阶段的过程。细胞凋亡对控制肿瘤的发生和发展起着非常重要的作用,本实验证明西罗莫司处理后 AML 细胞株 Kasumi-1 的增殖率明显下降,凋亡率显著上升,并且使细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期,提示西罗莫司可以作为一种潜在的 AML 临床治疗药物。

西罗莫司最初作为免疫抑制剂应用于抑制器官移植后的免疫排斥反应,其免疫抑制功效显著高于环孢素,而且到目前为止尚未发现西罗莫司存在明显的肾毒性^[4]。近几年来发现其具有抗肿瘤作用,并逐渐应用于临床。西罗莫司是哺乳动物西罗莫司靶蛋白(mTOR)特异性抑制剂。而 mTOR 作为一种重要的信号传导分子通过调节细胞周期、蛋白质合成、细胞能量代谢等多种途径,在细胞的增殖、生长、分化、凋亡和细胞周期调节过程中起着关键的作用^[5]。在西罗莫司处理 Kasumi-1 细胞后,其生长受到抑制,这和其他 AML 细胞株表现一致^[6]。本研究发现,西罗莫司处理 Kasumi-1 细胞后, G_0 和 G_1 期细胞明显增加,S 期细胞显著减少,其可能的机制为:西罗莫司可以选择性地抑制被磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 信号通路激活的 mTOR 活性,阻断 mTOR 介导的信号通路,使其下游信号蛋白 4E-BP1 和 p70S6K 的磷酸化水平下降,而抑制了参与 G_1 -S 细胞周期转换的蛋白 mRNA 的翻译,使肿瘤细胞阻滞在 G_0/G_1 期,进而导致细胞凋亡^[7-11]。这将是笔者下一步实验需要探明的问题。

笔者在实验中还发现,西罗莫司浓度在 0.1~100 ng/mL 区间时,表现为剂量依赖性,Kasumi-1 细胞的增殖抑制率和凋亡率都随药物剂量的上升而增加,但 100 ng/mL 和 200 ng/mL 两组之间差异不显著,说明 100 ng/mL 左右的西罗莫司对 AML 细胞株 Kasumi-1 的影响达到最大效应。这一原因可能是因为 mTOR 的作用方式可能同时存在西罗莫司的依赖和非依赖途径^[12]。

本实验的结果表明,西罗莫司可以抑制 Kasumi-1 细胞增殖,同时促进其凋亡,并使细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期,显示了其作为临床药物的应用前景。HSCT 手术使用西罗莫司可以抑制机体自身的免疫排斥反应,同时促进残(下转第 1560 页)

中起着非常重要的作用^[7]。

本研究以 T2DM 高脂血症患者为研究对象,首次在国内对 HSL 基因启动子-60C>G 多态性与血脂水平的相关性进行了研究。结果发现 HSL - 60 位基因型和等位基因频率分布虽然在试验组较高,但两组间差异无统计学意义,分析其一方面可能与研究对象的种族和地区有关,另一方面可能与样本量有关。本组研究中健康对照组 C、G 等位基因频率与英格兰^[8]和加拿大^[12]的报道相似。两组间不同基因型血脂水平存在差异,然而组内 CC 型和 CG 型血脂水平的差异无统计意义,因此这种差异是来源于试验组对象的高脂血症,还是由于 G 等位基因型的脂代谢保护作用,还有待于加大样本和更深入的研究进一步证实。

参考文献

[1] Mikhail N. The metabolic syndrome; insulin resistance[J]. Curr Hypertens Rep, 2009, 11(2): 156-158.
 [2] Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007, 10(2): 142-148.
 [3] 陈瑜, 李杨, 杨刚毅. 游离脂肪酸在 2 型糖尿病发病机制中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(10): 915-917.
 [4] Duncan BB, Schmidt MI, Ballantyne CM, et al. Fasting plasma free fatty acids and risk of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study[J]. Diabetes Care, 2004, 27(1): 77-82.
 [5] 张婷婷, 徐冲, 俎鲁霞, 等. 高浓度葡萄糖刺激脂肪细胞脂肪分解的效应及其机制[J]. 北京大学学报(医学版), 2008, 40(3): 273-

279.

[6] 李学英, 葛斌, 路健, 等. 遵义地区人群激素敏感性脂肪酶基因第 6 内含子多态性与 2 型糖尿病的关系[J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(12): 721-722.
 [7] Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase——new roles for an old enzyme[J]. Biochem J, 2004, 379(Pt 1): 11-22.
 [8] Talmud PJ, Palmen J, Wolf AM, et al. Investigation into the role of the hormone sensitive lipase - 60C>G promoter variant in morbid obesity[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2005, 15(1): 31-35.
 [9] Garenc C, Vohl MC, Boucharde C, et al. LIPE C - 60G influences the effects of physical activity on body fat and plasma lipid concentrations; the Quebec family study[J]. Hum Genomics, 2009, 3(2): 157-168.
 [10] Talmud PJ, Palmen J, Luan J, et al. Variation in the promoter of the human hormone sensitive lipase gene shows gender specific effects on insulin and lipid levels: results from the Ely study[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1537(3): 239-244.
 [11] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(5): 390-420.
 [12] Garenc C, Pérusse L, Chagnon YC, et al. The hormone-sensitive lipase gene and body composition; the heritage family study[J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002, 26(2): 220-227.

(收稿日期: 2010-07-29)

(上接第 1557 页)

留白血病骨髓细胞的凋亡, 减少复发的概率。

参考文献

[1] Yoshizawa A, Fukuoka J, Shimizu S, et al. Overexpression of phosphor-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(1): 240-248.
 [2] Wang X, Yue P, Kiml YA, et al. Enhancing mTOR-targeted cancer therapy by preventing mTOR/raptor inhibition-initiated, mTOR/rector-independent Akt activation[J]. Cancer Res, 2008, 68(18): 7409-7418.
 [3] Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(18): 353-361.
 [4] Hon JC, Kahan BD. Rapamycin and transplantation[J]. Transplantation, 1999, 68(5): 701-704.
 [5] 黄玲, 陈雪梅, 何俊琳, 等. 雷帕霉素对绒癌 JEG-3 细胞株的影响[J]. 激光杂志, 2010, 31(2): 93-94.
 [6] Recher C, Beyne-Ranzoy O, Demur C, et al. Antileukemic of activit of rapamycin in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2005, 105(6): 2527-2534.
 [7] Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin(TOR): an integrator of

nutrient and growth factor signals and coordinator of cell and cell cycle progression[J]. Oncogene, 2004, 23(18): 3151.

[8] Gao N, Flynn DC, Zhang Z, et al. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(2): C281-291.
 [9] Gao N, Zhang Z, Jiang BH, et al. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(4): 1124-1132.
 [10] West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance[J]. Drug Resist Updat, 2002, 5(6): 234-248.
 [11] Martelli AM, Tabellini G, Bortul R, et al. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias[J]. Histol Histopathol, 2005, 20(1): 239-252.
 [12] Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(1): 200-216.

(收稿日期: 2011-04-15)

参数与统计量

描述总体特征的数值为参数,通常是未知的,一般用希腊字母表示,如 μ, σ, π 等。描述样本特征的数值为统计量,是已知的或可计算获得的,用英文字母表述,如 S, P 等。从总体中随机抽样可获得样本,以样本为基础、通过统计推断(参数估计、假设检验)可获得对总体的认识。