

• 基础实验研究论著 •

三氧化二砷诱导耐药和敏感白血病细胞凋亡机制的比较

王春霞¹, 马艳云¹, 胡建勇^{2△}

(1. 兰州市第一人民医院检验科, 甘肃兰州 730050; 2. 定西市人民医院检验科, 甘肃定西 743000)

摘要:目的 探讨三氧化二砷(As_2O_3)诱导耐药白血病细胞(K562/ADM 细胞)凋亡的是否有异于对药物敏感的白血病细胞(K562 细胞)。方法 采用流式细胞术(FCM) AnnexinV/PI 双标检测细胞凋亡,通过电镜观察凋亡细胞内质网和线粒体形态结构变化;FCM 测定细胞内 Ca^{2+} 和 Caspase-3 活性;Western blot 检测葡萄糖调节蛋白 78(GRP78/Bip)的表达。结果 As_2O_3 诱导 K562 和 K562/ADM 细胞发生凋亡过程中,内质网明显扩张和脱颗粒,线粒体内、外膜融合,内膜扩张呈空泡样变,嵴紊乱、肿胀,细胞质 Ca^{2+} 浓度升高和 Caspase-3 活性明显增强,K562/ADM 细胞的变化更为明显。K562/ADM 细胞 GRP78 表达增高,而 K562 细胞并无明显变化。结论 As_2O_3 可诱导 K562/ADM 细胞发生内质网应激反应,使得该细胞通过内质网-线粒体途径凋亡。其诱导 K562 细胞凋亡的机制与之不同,是通过经典的线粒体途径导致细胞凋亡。

关键词:砷剂; 细胞凋亡; 白血病; 抗药性,肿瘤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)16-2075-03

Comparative study on the mechanism of arsenic trioxide-induced apoptosis in drug-resistant and sensitive leukemia cells

Wang Chunxia¹, Ma Yanyun¹, Hu Jianyong^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou, Gansu 73000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the First people's Hospital of Dingxi City, Dingxi, Gansu 743000, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether the mechanism of arsenic trioxide(As_2O_3)-induced apoptosis in drug-resistant leukemia cells(K562/ADM) is different from that in sensitive leukemia cells(K562). **Methods** The apoptosis of K562 cells and K562/ADM cells were detected by flow cytometry(FCM), in which cells were double labeled with FITC-Annexin V and PI. The morphological ultrastructures of the cells, including endoplasmic reticulum and mitochondria were observed through transmission electron microscopy. FCM was employed to detect intracellular calcium concentration and caspase-3 activity. The expression of GRP78 was detected by Western blot. **Results** During the apoptotic process of the two cell types, the endoplasmic reticulum exhibited obvious expansion and degranulation, the mitochondria showed fusing inner and outer membranes, disorder and swelling cristae. In addition to that, the inner membrane of mitochondria expanded and exhibited vacuolar degeneration. Meanwhile, The intracellular calcium concentration increased and caspase-3 was activated, especially obviously in K562/ADM cells. Upregulation of GRP78 at endoplasmic reticulum in apoptotic K562/ADM cells were detected by Western blot, but not in K562 cells. **Conclusion** As_2O_3 can initiate the endoplasmic reticulum stress in K562/ADM cells, and causes the apoptosis of drug-resistant cell via endoplasmic reticulum-mitochondrial pathway, while induces K562 cells to apoptosis via the classic mitochondrial pathway.

Key words: arsenicals; apoptosis; leukemia; drug resistance, neoplasm

凋亡抑制是白血病细胞发生耐药的主要机制之一。三氧化二砷(As_2O_3)在体内、外对白血病以及其他实体肿瘤均具有较好的抗肿瘤效应,不良反应小且与常规化疗药物无交叉耐药^[1]。本课题组前期研究已证实, As_2O_3 可诱导对常规抗肿瘤药物耐受的白血病多药耐药细胞的凋亡,并对多种耐药、凋亡相关基因的表达具有调控作用^[2-4]。 As_2O_3 诱导肿瘤细胞凋亡的机制比较复杂,本研究旨在比较对常规化疗药物耐药和敏感的白血病细胞,即 K562/ADM 和 K562 细胞在 As_2O_3 诱导其凋亡时的机制,为肿瘤的治疗、多药耐药的逆转以及抗肿瘤药物的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 使用的仪器包括流式细胞仪(Beckman-Coulter Epics XL, Beckman Coulter 公司)、 CO_2 培养箱(HER-ACELL 150, Heraeus 公司)、铀铅双重染色后用透射电镜(JEM-1230, 日本电子公司)、Odyssey 双色红外激光成像系统(美国 LI-COR 公司)。 As_2O_3 试剂为 Sigma 公司产品,用 1.0 mol/L 的 NaOH 溶解,调节 pH 值至 7.0,配成 1 mmol/L 溶液贮存备用;Annexin V/PI 试剂盒、FITC 荧光标记的活性

Caspase-3 抑制物 DEVD-FMK 均为 Biovision 公司产品;阿霉素(ADM)为日本明治制药公司产品;钙离子荧光探针 Fluo-3/AM 为 Fluka 公司产品;兔抗人葡萄糖调节蛋白 78(GRP78/Bip)抗体为 Spring 公司产品;鼠抗人 β -actin 抗体为 Biovision 公司产品;IRDye700DX 标记的羊抗兔和 IRDye800CW 标记的羊抗鼠红外荧光 IgG 抗体购自 LI-COR 公司;15%新生牛血清来自杭州四季青公司、RPMI 1640 培养液购自美国 Gibco BRL 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 K562 和 K562/ADM 细胞由兰州大学医学实验中心保存。细胞接种于含 15% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置于 37℃、5% CO_2 且全湿的条件下培养。K562/ADM 耐药细胞定期加入 ADM(3~6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)以刺激 *mdr1* 基因编码的 P-糖蛋白(*mdr1*/P-gp)持续高表达。无 ADM 培养基继续培养 2 周后用于实验。 As_2O_3 处理:K562 和 K562/ADM 细胞分别按 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 接种,加入 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As_2O_3 ,置 CO_2 培养箱培养 12~72 h 后,收集细胞用于后续实验。对照细胞为未经 As_2O_3 处理的 K562 和 K562/ADM 细胞。

1.2.2 流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡 收集待测细胞,采用 Annexin V/PI 双标,使用流式细胞仪进行检测^[4]。

1.2.3 细胞的形态学观察 离心收集待观察的细胞,采用 3%戊二醛固定,经脱水、环氧树脂包埋后进行超薄切片,铀铅双重染色后用透射电镜观察细胞内质网和线粒体等超微结构的形态学特征。

1.2.4 细胞内 Ca^{2+} 浓度测定 细胞经 PBS 洗涤后,加入荧光探针附载剂 PF-123 和 Ca^{2+} 荧光探针 Fluo-3/AM, 37℃ 孵育 30 min,冷 PBS 洗涤 2 遍,500 μL PBS 重悬,采用 FCM 检测^[5-7]。

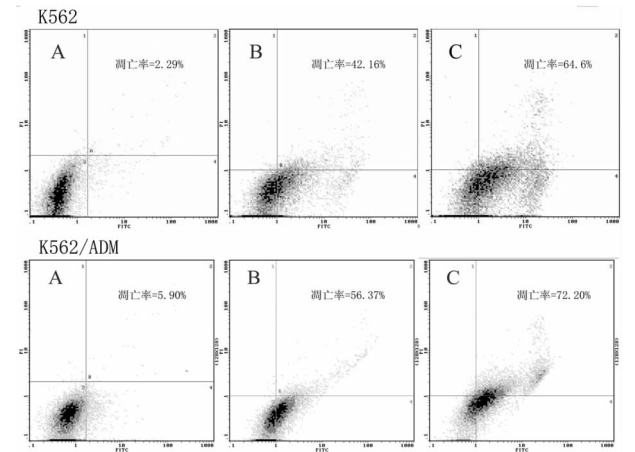
1.2.5 Caspase-3 活性检测 细胞 PBS 洗涤后,加入 FITC-DEVD-FMK,37℃ 孵育 1 h,洗涤,FCM 检测细胞内活化的 Caspase-3。

1.2.6 Western blot 检测 GRP78 的表达 根据文献^[8]的方法改进,收集对照细胞和 As_2O_3 处理 24 h 的细胞,PBS 洗涤后,加入细胞裂解液裂解。细胞裂解上清液用于 Western blot 检测,使用的一抗为兔抗人 GRP78 抗体和鼠抗人 β -actin 抗体,二抗为 IRDye700DX 标记的羊抗兔和 IRDye800CW 标记的羊抗鼠红外荧光二抗,采用 Odyssey 双色红外激光成像系统扫描和分析,以 GRP78 与 β -actin 条带的光密度值之比表示该蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析。组间比较采用 t 检验,显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 细胞凋亡的 FCM 检测 见图 1,K562 和 K562/ADM 细胞经 2 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 24 h 后,凋亡率明显增高。K562 细胞的凋亡率分别为 42.16% 和 64.6%(对照细胞为 2.29%),差异有统计学意义($P<0.05$)。K562/ADM 细胞的凋亡率分别为 56.37% 和 72.20%(对照细胞为 5.90%),差异有统计学意义($P<0.05$)。 As_2O_3 能诱导 K562 及 K562/ADM 细胞凋亡。

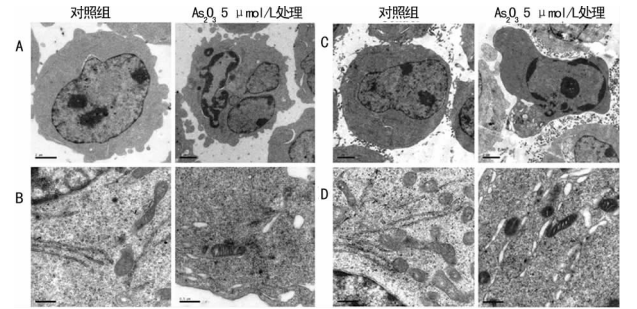


A: 对照细胞;B: 经 2 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 24 h 的细胞;C: 经 5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 24 h 的细胞。

图 1 FCM 检测细胞凋亡

2.2 凋亡细胞内质网和线粒体形态学改变 As_2O_3 处理 24~72 h,K562 和 K562/ADM 细胞均出现细胞核固缩、染色质浓聚在核膜边缘及凋亡小体形成等典型凋亡形态学改变(图 2A、C)。凋亡细胞内质网出现明显扩张、脱颗粒等形态结构改变;线粒体内外膜融合,嵴减少且紊乱;部分线粒体肿胀,内膜扩张,出现空泡样变(图 2B、D)。 As_2O_3 诱导的细胞凋亡过程中,K562 和 K562/ADM 细胞的内质网和线粒体形态结构均发生

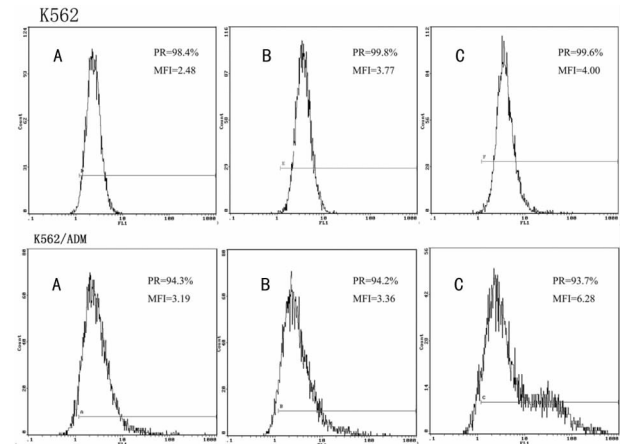
了改变,以 K562/ADM 细胞的变化更为明显。



A:K562 细胞核的形态;B:K562 细胞内质网、线粒体的形态;C: K562/ADM 细胞核的形态;D: K562/ADM 细胞内质网、线粒体的形态。

图 2 As_2O_3 处理前后 K562 和 K562/ADM 细胞的电镜观察

2.3 胞质 Ca^{2+} 浓度的检测 2 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 诱导 K562 和 K562/ADM 细胞 24 h 后,K562 胞质内 Ca^{2+} 平均荧光强度(MFI)由 2.48 增加到 3.77 和 4.00,差异有统计学意义($P<0.05$)。K562/ADM 胞质内 Ca^{2+} 平均荧光强度由 3.19 增加到 3.36 和 6.28,差异有统计学意义($P<0.05$)。 As_2O_3 可诱导内质网储存的 Ca^{2+} 释放而增高胞质内 Ca^{2+} 水平,以 K562/ADM 细胞的变化为甚。



A: 对照细胞;B: 经 2 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 24 h 的细胞;C: 经 5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 24 h 的细胞。

图 3 FCM 检测 Ca^{2+} 水平

2.4 细胞 Caspase-3 活性的检测 经 2 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 24 h 后,细胞 Caspase-3 活性增高,K562 细胞中 caspase-3 激活的细胞比例由对照细胞的 54.1% 增加至 72.7% 和 64.4%,差异有统计学意义($P<0.05$);K562/ADM 细胞中 Caspase-3 激活的细胞比例由对照细胞的 39.6% 增加至 64.9% 和 86.9%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 GRP78 蛋白水平的检测 GRP78/Bip 为内质网分子伴侣蛋白,是内质网应激反应的主要标志分子之一。2 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 K562/ADM 细胞 24 h 后,Western blot 检测显示,GRP78 的表达明显增高,分别增高 144.2% 和 392.9%,差异有统计学意义($P<0.05$),而 K562 细胞 GRP78 表达无明显变化。

3 讨 论

内质网应激反应性凋亡途径是不同于经典的死亡受体途径和线粒体途径的细胞凋亡途径。内质网是细胞蛋白质合成、修饰、运输以及 Ca^{2+} 存储的场所,对细胞应激反应、细胞内 Ca^{2+}

水平以及蛋白质合成、折叠和运输具有重要调节作用。当新合成的蛋白质 N 末端糖基化、二硫键形成以及蛋白质由内质网向高尔基体转运等过程受阻时,非折叠或非正确折叠的新合成蛋白质在内质网中大量堆积而导致非折叠蛋白质反应(UPR)。同时,内质网调节细胞内 Ca^{2+} 的存贮、摄取和释放,在细胞内 Ca^{2+} 稳态、细胞功能维持和细胞内信号传导等过程中发挥重要作用。内质网 UPR 和 Ca^{2+} 稳态的破坏均可导致内质网应激,进一步发展可引起细胞凋亡,即内质网应激反应性凋亡^[9-10]。

白血病细胞对 As_2O_3 和常规抗肿瘤药物不会产生交叉耐药性,对化疗药物耐药的肿瘤细胞对 As_2O_3 仍保持其敏感性,并促使肿瘤细胞凋亡,这些优点使砷剂作为一种独特的抗肿瘤药物而备受瞩目。 As_2O_3 的抗肿瘤(白血病)机制比较复杂,包括抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,诱导肿瘤细胞分化,抑制肿瘤新生血管的形成,下调端粒酶活性和调控凋亡相关基因等^[1-4]。目前普遍认为 As_2O_3 主要通过线粒体途径诱导肿瘤(白血病)细胞凋亡,也有研究发现 As_2O_3 可上调 Fas 的表达而通过 Fas/FasL 信号通路诱导肿瘤细胞凋亡^[11]。本课题组前期研究已经证实 As_2O_3 可以抑制化疗敏感及对常规化疗药物耐药的白血病细胞的增殖并诱导其凋亡,能上调 Fas 蛋白的表达,抑制 Bcl-2 和 Survivin 的表达^[2,4]。本研究中 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 和 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 能诱导化疗敏感及对常规化疗药物耐药的白血病细胞发生明显的凋亡现象,细胞出现典型的凋亡形态学改变,证实 As_2O_3 主要通过诱导细胞凋亡的方式发挥作用。

白血病细胞发生多药耐药后生物学特性发生了很大变化,凋亡抵抗现象是其重要特征。 As_2O_3 诱导对常规化疗药物耐药的白血病细胞凋亡的分子机制是否有异于化疗敏感的白血病细胞,目前研究报道不多。本研究发现, K562 和 K562/ADM 细胞经 As_2O_3 诱导发生凋亡时,内质网明显扩张、且有脱颗粒现象,线粒体内外膜融合,嵴紊乱,肿胀,内膜扩张呈空泡样变。胞质 Ca^{2+} 水平明显升高, Caspase-3 活性明显增强,提示内质网和线粒体参与了白血病细胞凋亡过程。内质网应激反应性凋亡是一种新的细胞凋亡通路^[10-11], GRP78/Bip 是内质网应激反应的主要标志分子之一^[9-10]。 As_2O_3 诱导 24 h 后,对常规化疗药物耐药白血病细胞的 GRP78 表达增高约 1.5~4.0 倍,表明 As_2O_3 诱导 K562/ADM 细胞发生了内质网应激反应,而化疗敏感白血病细胞的 GRP78 表达并无明显变化。已有研究证实内质网和线粒体在结构和功能上紧密联系, Ca^{2+} 是二者发生联系的主要信号分子,也是内质网-线粒体共同作用引发细胞凋亡的分子基础。 As_2O_3 可能与内质网膜上的含巯基酶(如 Ca^{2+} -ATP 酶)等作用诱发内质网应激,促使其 Ca^{2+} 大量释放入胞质,线粒体由于其膜电势梯度摄取 Ca^{2+} 而

致钙超载,增加线粒体对凋亡的敏感性而使其膜通透性改变和去极化,随后大量 Cyt C 释放入胞质,参与形成 cyt C/Apaf-1/caspase-9 凋亡体,引发 caspases 级联反应,最终活化细胞凋亡的执行人 caspase-3 而诱发细胞凋亡。

综上所述, As_2O_3 可诱导 K562/ADM 细胞经内质网应激反应途径凋亡,而对于 K562 细胞而言,可以引起 Ca^{2+} 释放入胞质,但并未引起 GRP78 表达增高,未诱发内质网应激反应。K562 细胞是通过典型线粒体途径发生细胞凋亡。

参考文献

- [1] Asou N. Arsenic trioxide in the treatment of relapsed and refractory acute promyelocytic leukemia[J]. Intern Med, 2005, 44(8): 818-824.
- [2] Wang DH, Wei HL, Zhao HS, et al. Arsenic trioxide overcomes apoptosis inhibition in K562/ADM cells by regulating vital components in apoptotic pathway[J]. Pharmacol Res, 2005, 52(5): 376-385.
- [3] Wei H, Su H, Bai D, et al. Arsenic trioxide inhibits p-glycoprotein expression in multidrug-resistant human leukemia cells that over-express the MDR1 gene[J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(11): 1644-1648.
- [4] 郭璐, 魏虎来, 张亚莉. 维生素 E 琥珀酸酯诱导 K562/ADM 细胞凋亡过程中线粒体结构和功能的改变[J]. 肿瘤, 2006, 26(11): 997-1001.
- [5] 刘仁则, 秦仁义. 用 Fluo3Am 荧光探针和流式细胞术检测活性腺泡细胞内游离钙离子[J]. 世界华人消化杂志, 1998, 6(4): 279.
- [6] 彭心昭, 陈英. 长春新碱诱导的自噬性凋亡与细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的相关性研究[J]. 解剖学研究, 2000, 22(1): 15-18.
- [7] 曹云新, 李豫容, 杨安钢. 流式细胞仪实时监测细胞内 Ca^{2+} 浓度变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24): 4481-4483.
- [8] Fu Y, Li J, Lee AS. GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast Cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis[J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3734-3740.
- [9] Lee AS. GRP78 induction in Cancer: therapeutic and prognostic implications[J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3496-3499.
- [10] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell Life and death decisions[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2656-2664.
- [11] Zhu J, Okumura H, Ohtake S, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in leukemia/lymphoma cell lines via the CD95/CD95L system[J]. Oncol Rep, 2003, 10(3): 705-709.

(收稿日期: 2013-02-25)

(上接第 2074 页)

- [8] 田秀芬, 汤建芬. β -catenin 在喉癌中的表达及临床意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 23(9): 416-418.
- [9] 任刚, 赵德安, 周毅, 等. β -catenin 拮抗因子 Chibby 对人喉癌细胞 Hep-2 增殖凋亡的影响[J]. 中国癌症杂志, 2012, 22(4): 276-282.
- [10] 赵岩, 胡俊兰, 王占龙, 等. β -连环蛋白、上皮钙黏蛋白及 Wnt 1 在喉癌中的表达及意义[J]. 河北医药, 2009, 31(7): 775-778.
- [11] 桑建中, 刘丽, 田芳, 等. 人喉鳞癌组织中 c-myc 蛋白的表达及 c-myc siRNA 下调喉癌 Hep-2 细胞中 c-myc 的表达对细胞增殖的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 25(15): 695-700.
- [12] 郭慧, 杜波, 李晓明, 等. 携 EGFP 的 STAT3 载体构建、表达及其对 HEP-2 细胞的增殖抑制作用[J]. 山东医药, 2008, 48(3): 18-

20.

- [13] Holvoet S, Vincent C, Schmitt D, et al. The inhibition of MAPK pathway is correlated with down-regulation of MMP-9 secretion induced by TNF-alpha in human keratinocytes[J]. Exp Cell Res, 2003, 290(1): 108-119.
- [14] Sanceau J, Truchet S, Bauvois B. Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(38): 36537-36546.

(收稿日期: 2013-04-25)