

论著·基础研究

高三尖杉酯碱对 HL60 细胞程序性凋亡的影响及机制研究^{*}宋霞¹, 陈涛², 张炜^{3△}, 刘纯¹, 陈明¹(1. 兰州大学第一医院核医学科, 兰州 730000; 2. 甘肃省康复中心医院检验科, 兰州 730000;
3. 兰州大学第一医院中心实验室, 兰州 730000)

摘要:目的 探究高三尖杉酯碱(HHT)对人急性髓系白血病 HL60 细胞凋亡的影响及其机制。方法 以人急性髓系白血病 HL60 细胞系作为研究对象, 实验分为对照组和 HHT 处理组, 对照组不加 HHT, 处理组分别加入 0.2、0.4、0.6、1.2 mg/L HHT 并分别培养 24、48、72、96 h, 制作细胞生长曲线; 通过细胞克隆形成试验计算 0.1、0.3、0.6 mg/L HHT 处理后 HL60 细胞克隆形成率; 蛋白质印迹法(Western blot)检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、原癌基因(c-myc)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)及 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达; 流式细胞仪检测 HL60 细胞的凋亡情况。结果 随着 HHT 处理浓度的增加, 细胞抑制率逐渐升高, 与 HHT 处理成剂量依赖性, 1.2 mg/L 时细胞抑制效果最佳。随着 HHT 处理浓度的增加, 细胞克隆形成率逐渐下降, 与处理剂量呈依赖性, 0.6 mg/L 处理时, 细胞克隆形成率最低。1.2 mg/L HHT 处理 HL60 细胞 48 h 后, Bcl-2、c-myc 蛋白表达水平下降, caspase-3、Bax 蛋白表达量升高。细胞流式仪检测 HL60 细胞经 0.6 mg/L HHT 处理 48 h 后, 细胞出现大量凋亡。结论 HHT 能够抑制 HL60 细胞增殖、诱导其凋亡, 其机制可能与上调 caspase-3、Bax 蛋白及下调 Bcl-2、c-myc 蛋白表达相关。

关键词:高三尖杉酯碱; 细胞凋亡; B 淋巴细胞瘤-2 基因; 原癌基因**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.20.002 **中图法分类号:**R733.7; R285.5**文章编号:**1673-4130(2018)20-2471-04**文献标识码:**A**Mechanism and influences of Homoharringtonine on apoptosis of HL60 human acute myeloid leukemia cell line^{*}**SONG Xia¹, CHEN Tao², ZHANG Wei^{3△}, LIU Chun¹, CHEN Ming¹(1. Department of Nuclear Medicine, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China;
2. Department of Clinical Laboratory, Gansu Province Hospital Rehabilitation Center, Lanzhou, Gansu 730000, China;
3. Central Laboratory, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To investigate the influences of homoharringtonine on apoptosis of HL60 human acute myeloid leukemia cell line and their mechanism. **Methods** HL60 cells were studied and divided into the control group and the study group. The control group was cultured without HHT. The study group were added 0.2, 0.4, 0.6, 1.2 mg/L HHT, and cell proliferation plots were curved after been cultured 24, 48, 72, 96 h respectively. The cloning efficiency of HL60 cells was measured by colony formation assays after 0.1, 0.3, 0.6 mg/L HHT were added to other study group. The expression of caspase-3, proto-oncogene c-myc, Bcl-2, Bax were detected by Western blot. The apoptotic rate was also detected by FCM. **Results** The inhibition rate of HL60 cells was gradually increased with the concentration of HHT in a dose dependent manner. The 1.2 mg/L HHT was the most sensitive concentration for HL60 cells. With the increased of the concentration of HHT, the cloning efficiency of HL60 cells was gradually decreased in a dose dependent manner. The cloning efficiency of HL60 cells was the lowest after adding 0.6 mg/L HHT. The expression level of Bcl-2, c-myc decreased and the expression level of caspase-3 and Bax were increased after 48 h cultured which added 1.2 mg/L HHT. FCM showed a large amount of apoptotic HL60 cells which were processed with 0.6 mg/L HHT and 48 h cultured. **Conclusion** Homoharringtonine can inhibit the proliferation of HL60 cells and induce the apoptosis, and the mechanism is probably related to the up-regulation of caspase-3 and Bax and down-regulation of Bcl-2 and c-myc.

^{*} 基金项目: 兰州大学自然科学类“中央高校基本科研业务费专项资金”课题(lzujbky-2012-196)。

作者简介: 宋霞, 女, 副主任技师, 主要从事临床免疫学研究。△ 通信作者, E-mail: zw_email@aliyun.com。

本文引用格式: 宋霞, 陈涛, 张炜, 等. 高三尖杉酯碱对 HL60 细胞程序性凋亡的影响及机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(20): 2471-2474.

Key words: homoharringtonine, apoptosis; Blymphocytoma-2 gene; proto-oncogene

白血病是属于造血干细胞恶性克隆性病变,据报道,在各种肿瘤中白血病的发病率居第6位^[1],对正常造血功能产生很强的抑制作用,严重影响身体健康。高三尖杉酯碱(HHT)是从植物三尖杉类根、茎、叶中分离出的抗肿瘤生物碱化合物,临床研究表明HHT对急性早幼粒细胞白血病、急性粒细胞白血病等急性髓系白血病治疗效果较好,完全缓解率较高^[2],且主要通过诱导白血病细胞凋亡来发挥其药理作用^[3],本研究以人急性髓系白血病系白血病HL60细胞作为研究对象,通过细胞培养、细胞克隆形成实验、蛋白质印迹法(Western blot)、流式细胞仪等方法检测HHT对HL60细胞的凋亡及对其机制进行初步探究,以期为研究HHT诱导HL60细胞凋亡启动方面奠定一定的理论基础。

1 材料

1.1 实验细胞 人急性髓系白血病系HL60细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.2 仪器与试剂 500全自动酶标仪(Bio-Rad公司);UV-1801紫外分光光度计(北京瑞利仪器分析有限公司);FACS Calibur流式细胞仪(Becton Dickinson公司);ImageQuant350凝胶成像系统(GE Healthcare)。HHT购自杭州民生药业有限公司,改良型双抗RPMI-1640培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、改良杜氏伊格尔培养基(DMEM)培养基等购自Gibco公司,二甲基亚砜(DMSO)、甲臜(MTT)试剂购自Sigma公司,Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔二抗、一抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、原癌基因(c-myc)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、β肌动蛋白(β-actin)等购自BD Biosciences公司。

1.3 方法

1.3.1 MTT法检测细胞抑制作用 取生长至对数期的HL60细胞,调整细胞密度为 1.5×10^5 /mL,接种200 μL 96孔培养板实验分为5组,对照组不添加HHT处理,药物处理组加入不同浓度HHT:0.2、0.4、0.6、1.2 mg/L,每组设置4个重复,置于37 °C 5%CO₂培养箱内,分别培养24、48、72、96 h,结束后加入20 μL MTT,37 °C反应4 h,弃去上清液加入100 μL DMSO溶液,37 °C反应30 min,570 nm下测定各组的吸光度(A值),计算细胞抑制率=(A_{空白组}-A_{实验组})/A_{空白组} × 100%。

1.3.2 细胞克隆形成实验 取对数期细胞接种于细胞培养板中,设置对照组不加HHT,实验组加入0.1、0.3、0.6 mg/L HHT,每组设置4个重复,置于37 °C 5%CO₂培养箱培养至对数期,加入0.25%胰蛋白酶消化为单细胞悬浮液,将细胞悬浮液分别稀释1倍、2

倍、4倍,接种于培养皿中置于37 °C 5%CO₂培养箱中培养1周,当出现肉眼可见克隆时,弃去培养液用磷酸缓冲盐溶液(PBS)溶液清洗2次,添加5 mL 4%多聚甲醛固定细胞15 min,加入吉姆萨染料(GIM-SA)染色30 min,清洗后在空气中干燥,计算克隆数目。克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%。

1.3.3 Western blot检测凋亡相关蛋白的表达 采用1.2 mg/L HHT处理48 h后对HL60细胞总蛋白的提取,喹啉酸蛋白质浓度测定法(BCA)测定蛋白浓度,配制8%、12.5%的分离胶与浓缩胶,取30 μg蛋白进行上样,电泳起始电压80 V,当样品指示剂进入分离胶后,电压调至120 V,反应结束后将蛋白凝胶转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,加入脱脂牛奶进行封闭4 h,用Tris-HCl-Tween缓冲盐溶液(TBST)稀释一抗(caspase-3、c-myc、Bcl-2、Bax、β-actin)4 °C震荡过夜,加入PBS清洗3次,每次10 min,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下反应2 h, PBS溶液清洗3次,每次10 min。采用凝胶成像仪对Western blot产生的条带进行定量分析,保存图片。

1.3.4 流式细胞仪检测HL60细胞的凋亡 取对数期生长细胞接种于细胞培养板中,调整细胞液密度为 10^3 个/m³,对照组添加DMSO溶液,实验组加入0.6 mg/L HHT,37 °C反应48 h后,收集细胞,加入PBS溶液清洗后加入碘化丙啶(PI)溶液,避光反应20 min,采用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

1.4 统计学处理 采用SPSS18.0软件对实验所得数据进行处理分析,计数资料采用率表示,采用 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT法检测HL60细胞抑制作用 与对照组相比,不同浓度HHT处理后细胞受到不同程度的抑制,随着HHT处理浓度的增加,细胞抑制率升高,与HHT处理成剂量依赖性。1.2 mg/L时达到最大,此时细胞抑制效果最佳。见图1、表1。

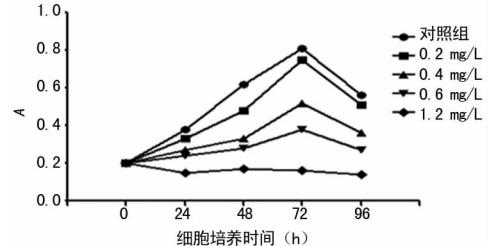


图1 不同浓度HHT处理后细胞生长曲线

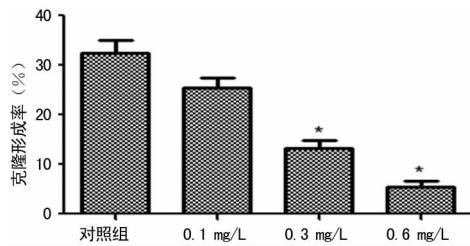
2.2 细胞克隆形成实验 加入不同浓度的HHT后,细胞克隆形成率下降,随着HHT处理浓度的增加,细胞克隆形成率逐渐下降,与处理剂量呈依赖性,0.6 mg/L处理时,细胞克隆形成率最低。见图2。

2.3 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达 与未处理 HL60 细胞相比, 1.2 mg/L HHT 处理 HL60 细胞 48 h 后凋亡蛋白 Bcl-2、c-myc 蛋白表达水平下降, caspase-3、Bax 蛋白表达量升高。表明, HHT 处理 HL60 细胞凋亡与下调 c-myc、Bcl-2 蛋白, 上调 caspase-3、Bax 蛋白相关。见图 3。

表 1 48 h 时细胞抑制率

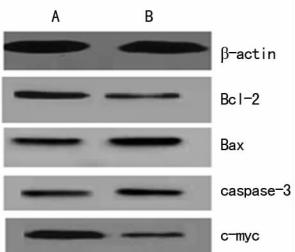
组别	A 值	抑制率(%)
对照组	0.73±0.11	—
0.2 mg/L	0.62±0.03	12.43
0.4 mg/L	0.44±0.16*	47.82
0.6 mg/L	0.27±0.02*	67.53
1.2 mg/L	0.11±0.01*	81.36

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; — 表示无数据



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

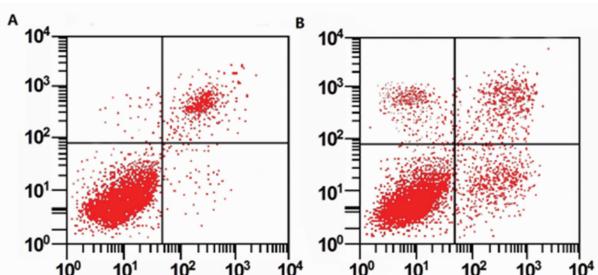
图 2 不同浓度 HHT 处理后 HL60 克隆形成率



注: A. 对照组; B. 1.2 mg/L HHT 处理 48 h

图 3 免疫印迹检测蛋白表达情况

2.4 细胞流式仪检测 HL60 细胞凋亡 细胞流式仪检测结果显示未经 HHT 处理的对照组 HL60 细胞凋亡率 ($5.38 \pm 1.67\%$), 经 0.6 mg/L HHT 处理 48 h 后的实验组, 细胞出现大量凋亡, 细胞凋亡率为 ($61.43 \pm 5.38\%$), 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 HHT 能够诱导 HL60 细胞凋亡。见图 4。



注: A. 未经 HHT 处理 HL60 细胞; B. 0.6 mg/L HHT 处理 48 h

图 4 细胞流式仪检测 HL60 细胞凋亡

3 讨 论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 在正常组织中细胞凋亡与细胞增殖的平衡维持稳定十分重要, 当平衡状态失调可引发肿瘤的发生^[4]。以往研究表明细胞增殖失衡是白血病主要发病原因, 近年研究报道有调控白血病细胞凋亡的通路, 若通路受到抑制, 则白血病细胞存在时间延长, 白血病细胞增殖与凋亡的动态平衡遭到破坏, 从而导致白血病的发生^[5]。有相关研究表明通过诱导白血病细胞凋亡的方法治疗白血病相比应用抗肿瘤药物毒副作用更小, 疗效更好^[6], 因此寻找诱导白血病细胞凋亡的新型药物是目前治疗白血病主要研究方向。

研究表明 HHT 能抑制白血病细胞蛋白质的生成, 降解多聚核糖体聚, 进而抑制白血病细胞增殖^[7]; 体外实验证实 HHT 对 G₁、G₂ 期增殖的白血病细胞抑制作用最强, 而对 S 期细胞作用较小, 从而发挥其对急性髓系白血病细胞白血病治疗^[8]。本研究通过采用不同浓度的 HHT 处理 HL60 白血病细胞, 细胞的增殖明显受到抑制, 且克隆形成试验显示较低浓度 HHT 即能抑制 HL60 细胞形成克隆, 表明 HHT 能够显著抑制白血病细胞 HL60 的增殖。

细胞凋亡后细胞内染色体降解形成核酸片段, 启动细胞内 caspase 蛋白酶, 进而激活凋亡途径相关蛋白, 引起细胞凋亡。caspase-3 属于蛋白凋亡家族 caspase 中的一员, 属于核酸内切酶, 能够执行细胞凋亡, 且激活 caspase-3 蛋白酶活后细胞即发生不可逆凋亡^[9-10]。有文献报道, 在多种肿瘤细胞凋亡时, caspase-3 蛋白表达上调^[11], 本研究中通过 HHT 处理后, caspase-3 蛋白表达上调, 且同时细胞受到显著的抑制作用, 表明 HHT 诱导细胞凋亡时, caspase-3 蛋白大量表达发挥其执行细胞凋亡作用。Bcl-2 属于抗凋亡蛋白, 在许多恶性肿瘤, 如肺癌、胃癌、非霍奇金氏淋巴瘤、白血病中大量表达。由于 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 形成异源二聚体而抑制 Bax 蛋白的活性。当 Bax 形成同源二聚体时能够诱导细胞凋亡, Bcl-2 蛋白表达上升, 而当同源二聚体 Bax 分开时, 其与 Bcl-2 形成异源二聚体, 抑制细胞凋亡^[12]。研究表明 Bcl-2 通过促进细胞生存的作用抑制细胞凋亡, 且过度表达将会是正常机体内细胞凋亡减少引发肿瘤^[13]。平娟等^[14]通过研究 HHT 对白血病作用机制中结果显示, HHT 主要通过下调 Bcl-2 上调 Bax 蛋白来抑制白血病细胞增殖, 本研究结果显示 HHT 处理后的 HL60 细胞内 Bcl-2 蛋白表达量下降, Bax 表达量上升, 表明 HHT 能够通过上调 Bax 下调 Bcl-2 抑制细胞的增殖。c-myc 基因是调控细胞增殖、凋亡的原癌基因, 有研究表明其在多种肿瘤细胞中异常表达。临床研究证明 c-myc 在早幼粒细胞白血病患者细胞中大量异常表达, 与其他多种癌基因共同作用下, 抑制细胞分化, 促进白血病细胞增殖, 破坏细胞增殖凋亡

平衡,最终导致白血病的发生^[15]。本研究结果中显示HHT处理后HL60细胞内c-myc蛋白表达量下调,表明HHT能够通过抑制c-myc蛋白表达抑制白血病细胞增殖。

4 结 论

HHT作为高效抗肿瘤药物,具有有效、不良反应小、经济实惠等特点,对HL60细胞有显著的凋亡作用,且通过上调caspase-3、Bax蛋白及下调Bcl-2、c-myc蛋白表达来实现对细胞的诱导凋亡作用,为白血病治疗提供一定的药理基础,关于HHT耐药性方面有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 李萍,梁爱斌.成人急性淋巴细胞白血病的诊疗进展[J].中国癌症杂志,2014,24(10):738-744.
- [2] 赵雨辰,杨明珍.高三尖杉酯碱对急性单核细胞白血病SHI-1细胞株诱导凋亡机制的研究[J].安徽医科大学学报,2014,49(8):1080-1084.
- [3] 许晓峰,程汝滨,杨波,等.茅莓总皂苷和高三尖杉酯碱、阿糖胞苷体外协同诱导白血病细胞凋亡的机制研究[J].中华中医药学刊,2015,13(7):1659-1663.
- [4] 周欢欢.BCL-2抑制剂ABT-737对AML细胞Kasumi-1的抗白血病效应及联合高三尖杉酯碱的化疗增效作用的机制探讨[D].南昌:南昌大学,2014.
- [5] 王迎,刘兵城,魏辉,等.高三尖杉酯碱在初诊中低危急性早幼粒细胞白血病中应用的前瞻性随机对照研究[J].中华血液学杂志,2016,37(3):55-57.
- [6] 封蔚莹,宋春娇,张志坚,等.喜树碱衍生物SN-38对人白血病细胞系HL60增殖及凋亡作用的实验研究[J].中华中医药学刊,2014,10(6):1406-1408.
- [7] 陈菲莉,柳约坚,李蓉蔚,等.雷公藤内酯与多柔比星诱导耐药白血病细胞凋亡协同作用及其机制的探讨[J].中华

(上接第2470页)

- [14] BISHOP A L, HALL A. Rho GTPases and their effector proteins[J]. Biochem J, 2000, 348(2):241-255.
- [15] JANK T, GIESEMANN T, AKTORIES K. Rho-glucosylating Clostridium difficile toxins A and B: new insights into structure and function[J]. Glycobiology, 2007, 17(4):15-22.
- [16] DAVIES D R, GELINAS A D, ZHANG C, et al. Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(49):19971-19976.
- [17] ROHLOFF J C, GELINAS A D, JARVIS T C, et al. Nucleic acid ligands with protein-like side chains: modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3:e201.
- [18] WANG Z W, WU H B, MAO Z F, et al. In vitro selection

肿瘤防治杂志,2014,21(10):66-70.

- [8] GAUTAM S, KIRSCHNE S, WIESMEIER M, et al. Roscovitine-induced apoptosis in neutrophils and neutrophil progenitors is regulated by the Bcl-2-family members Bim, Puma, Noxa and Mcl-1[J]. Plos One, 2014, 8(11):70-77.
- [9] 李秀军,罗心一,姚宇红,等.扶正祛邪含药血清对白血病耐药细胞株HL60/VCR细胞凋亡率的影响[J].中华中医药杂志,2014,12(8):2645-2647.
- [10] 姜熙,唐育梅,黄慧芳.高三尖杉酯碱抗急性粒细胞白血病效应及其机制研究进展[J].医学综述,2014,20(18):3345-3347.
- [11] 陈谨,周敏然,孙婷,等.抑制白血病K562细胞FoxM1表达可增强细胞对高三尖杉酯碱的敏感性[J].中国病理生理杂志,2015,31(11):1928-1932.
- [12] 袁龙,陈益,刘泽洪,等.吴茱萸碱抑制HDAC6促进人白血病K562细胞周期阻滞和凋亡的机制研究[J].中草药,2016,13(17):126-130.
- [13] DEEB D, GAO X, LIU Y B, et al. Pristimerin, a quinon-emethide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF- κ B/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic Bcl-2[J]. Inter J Oncol, 2014, 44(5):1707-1715.
- [14] 平娟,赵娜,王保全,等.人慢性粒细胞白血病bcr-abl基因反义寡核苷酸对K562细胞株的凋亡诱导作用研究[J].中国癌症杂志,2015,22(3):167-172.
- [15] JIANG H, ZHAO P J, SU D, et al. Paris saponin I induces apoptosis via increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 expression in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer in vitro and in vivo[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(6):2265-2272.

(收稿日期:2018-01-22 修回日期:2018-03-17)

and identification of ssDNA aptamers recognizing the Ras protein[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(3):1481-1488.

- [19] LOOMANS E E, ROELEN A J, VAN DAMME H S, et al. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Immunol Methods, 1995, 184(2):207-217.
- [20] OCHSNER U A, KATILIUS E, JANJIC N. Detection of clostridium difficile toxins a, B and binary toxin with slow off-rate modified aptamers[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 76(3):278-285.
- [21] NG E W, SHIMA D T, CALIAS P, et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(2):123-132.

(收稿日期:2018-02-26 修回日期:2018-05-28)