

• 临床研究 •

全反式维甲酸联合低剂量阿糖胞苷诱导 人急性粒-单核白血病细胞株 ACC247 凋亡的研究^{*}

刘召鑫¹ 任秀玉¹ 徐鑫¹ 赵瑶¹ 胡振波¹

[摘要] 目的:以急性粒-单核白血病细胞株 ACC247 为模型,采用全反式维甲酸(ATRA)、低剂量阿糖胞苷(Ara-C)单药及二者联合应用,观察其对 ACC247 细胞凋亡的影响。方法:用 ATRA、低剂量 Ara-C 单药及二者联合处理 ACC247 细胞 48 h 后,分别用 MTT 法检测细胞增殖状况,Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡,倒置显微镜观察细胞形态判断分化。结果:单独 ATRA 作用于 ACC247 细胞,随着作用时间的增加可见细胞体积膨胀,细胞核固缩,抑制其增殖并促进其向成熟分化,进而凋亡,呈时间依赖性,剂量固定为 1 $\mu\text{mol/L}$ 。单独低剂量 Ara-C 作用于 ACC247 白血病细胞,随着作用时间的增加可以使细胞数量减少,部分细胞核碎裂,细胞裂解,抑制其增殖并促进其凋亡,呈时间依赖性。ATRA 和低剂量 Ara-C 二者联合应用,对 ACC247 细胞增殖抑制与诱导凋亡作用增强。结论:ATRA 联合低剂量 Ara-C 可以抑制 ACC247 细胞增殖,促进其凋亡;联合用药的效果优于单用 ATRA 或 Ara-C。

[关键词] 全反式维甲酸;阿糖胞苷;ACC247 细胞;增殖;凋亡

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2015.03.005

[中图分类号] R733.71 **[文献标志码]** A

Differentiation and apoptosis of acute myelomonocytic leukemia cell line ACC247 induced by combination of ATRA and low dose Ara-C

LIU Zhaoxin REN Xiuyu XU Xin ZHAO Yao HU Zhenbo

(Graduate School of Weifang Medical University, Weifang, 261041, China)

Corresponding author: HU Zhenbo, E-mail: zhenbohu@wfm. edu. com

Abstract Objectives: To explore the effects of all-trans retinoid acid (ATRA) and low dose cytosine arabinoside (Ara-C), either individually or in combination on the proliferation, apoptosis and differentiation of acute myelomonocytic

leukemia cell line ACC247 cells. **Methods:** ACC247 cells were treated with ATRA and low dose Ara-C, either individually or in combination for different time. Cell proliferation was studied by MTT assay. Flow cytometry analysis of Annexin V-FITC/PI dual staining was used to examine apoptosis. Cell morphology was observed under the light microscope. **Results:** ATRA inhibited the proliferation and promoted differentiation of ACC247 cells in a time-dependent manner. Treatment of ACC247 cells by low dose Ara-C inhibited proliferation and induced apoptosis in a time-dependent manner. The combination of ATRA and Ara-C resulted in differentiation and apoptosis of ACC247 cells. **Conclusion:** Combination of ATRA and low dose Ara-C can inhibit proliferation, induce differentiation and apoptosis of ACC247 cells. The data suggests that combination usage of ATRA and low dose Ara-C may be a useful treatment for acute myelomonocytic leukemia (M4).

Key words all-trans retinoid acid; cytosine arabinoside; ACC247 cells; proliferation; apoptosis

急性髓系白血病是一类起源于造血干细胞的恶性克隆性疾病,尽管近年来以大剂量化疗为基础的治疗手段使其疗效有了明显提高,但大剂量化疗所带来的心、肾等脏器损害也不容忽视,如何在保证疗效的同时,降低化疗对脏器的损害值得关注。

全反式维甲酸(ATRA)是一组维生素 A 的衍生物,是目前临床上应用最为成功的分化诱导剂^[1]。ATRA 可通过诱导 RA 相关靶基因的表达而抑制细胞的分化,特别是对于有特征性的 t(15;17) 易位融合染色体 PML-RAR α 的急性早幼粒细胞白血病 (APL),已经成功应用 ATRA 治疗。然而,ATRA 在非 APL 患者中治疗无效。阿糖胞苷(Ara-C)是去氧胞苷类抗代谢药物,主要作用机制是通过抑制

^{*} 基金项目:国家自然科学基金(No:81370628)

¹ 潍坊医学院(山东潍坊,261041)

通信作者:胡振波, E-mail: zhenbohu@wfm. edu. com

细胞 DNA 的合成,达到干扰细胞增殖的目的,临床上广泛用于急性髓系白血病。二者联合用药时,在 ATRA 诱导幼稚细胞向成熟细胞分化的同时低剂量 Ara-C 又促进细胞凋亡,疗效更佳,降低了毒副作用,既不会增加白血病患者的脏器损害,同时也可以抑制白血病细胞增殖、促进凋亡。本实验中采用的 ACC247 细胞是具有急性早幼粒单核细胞表型的一类恶性增殖细胞群体,是研究髓系白血病治疗的良好模型。我们选用 ATRA 联合低剂量 Ara-C,观察其对 ACC247 细胞系的增殖抑制作用及凋亡促进作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

IMDM 培养液(GIBCO,美国);胎牛血清(FBS)(GIBCO,美国);ATRA(sigma,美国);Ara-C(sigma,美国);青霉素/链霉素(P/S)双抗(GIBCO,美国);MTT 试剂(sigma,美国);二甲亚砜(DMSO)(sigma,美国);Annexin V 试剂盒(Becton Dickinson,美国)。

1.2 细胞培养

急性粒-单核细胞白血病细胞株 ACC247 由多伦多大学安大略癌症研究所(Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada)馈赠,培养于含 10% FBS、10% 5637 细胞上清液(条件培养基)(5637 细胞系由美国克里弗兰医学中心馈赠)、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 IMDM 培养液中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。在倒置显微镜下观察细胞生长情况,2~3 d 传代 1 次。实验选用对数生长期细胞,分为 4 组:空白对照组、ATRA 组、Ara-C 组、ATRA 联合 Ara-C 组。

1.3 MTT 检测

取对数生长期 ACC247 细胞,1 000 $\times$ g 离心 5 min,弃上清,PBS 洗 1 次,用 IMDM 培养液重悬,调整细胞密度为 3 $\times$ 10⁵/ml,100 μ l/孔接种于 96 孔细胞培养板中,每组设置 3 个复孔。培养 24 h 后每孔分别加入 ATRA 1 μ mol/L 和不同浓度的 Ara-C(0.5、1、2、3、4、5 μ mol/L),培养 24、48、72 h 后分别加入 5 mg/ml 的 MTT 10 μ l,培养 4 h 后,在 1 000 $\times$ g 的条件下,离心 10 min,弃上清。所有孔均加入 150 μ l 的 DMSO,于振荡器上振荡 15 min,待颗粒完全溶解后,在酶联免疫检测仪 570 nm 波长处测定每孔 D(570)值,3 孔取平均值。按下列公式计算细胞抑制率:细胞抑制率(%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 值) $\times$ 100%。

1.4 细胞形态学观察

ATRA 联合低剂量 Ara-C 作用于 ACC247 细胞株 24、48、72 h 后,倒置显微镜下观察细胞分化形态。

1.5 细胞凋亡检测

收集对数生长期细胞,调整细胞密度为 1 $\times$ 10⁵/ml,接种于 24 孔板,并设立对照组。实验组分别加入 ATRA 1 μ mol/L 和低浓度的 Ara-C 0.05 μ mol/L 及二者联合用药,作用 ACC247 细胞 48 h 后,收集各组细胞,在 2 000 $\times$ g 的条件下离心 5 min 后,弃上清,用 4℃ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。离心弃上清收集细胞后,加入 Binding Buffer (10 $\times$) 100 μ l 重悬细胞,分别加入 5 μ l 的 FITC 及 5 μ l 的 PI,避光孵育 15 min,再加入 Binding Buffer (10 $\times$) 400 μ l 混匀,用 200 目尼龙膜滤过到流式管中,1 h 内进行流式细胞仪检测。Annexin V-FITC/PI 双染法判断凋亡。

1.6 统计学处理

ATRA 联合 Ara-C、二者单独处理的 ACC247 细胞抑制率组内与组间比较采用 T-TEST 中的双样本异方差检验,利用 STDEV 函数测得 ATRA 组、Ara-C 组、联合用药组标准误差分别为 0.007 09、0.014 97、0.012 89。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞标准曲线图

570 nm 下细胞标准曲线图,见图 1。

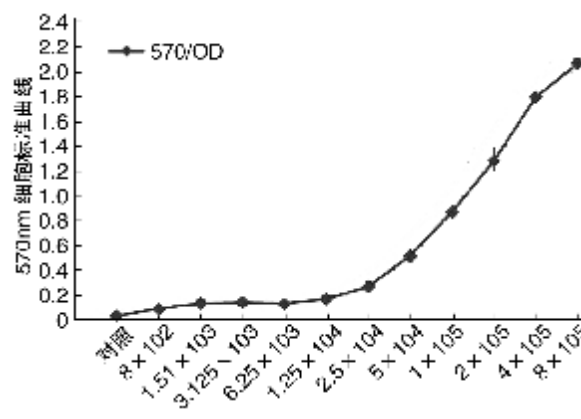


图 1 570 nm 下细胞标准曲线图

2.2 ATRA 联合低剂量 Ara-C 对 ACC247 细胞作用的形态学观察

空白对照组 ACC247 细胞体积大小均一,细胞透亮。而 ATRA 联合低剂量 Ara-C 作用于 ACC247 细胞株,培养 24 h 后于倒置显微镜下观察,细胞出现体积肿胀;培养 48 h 后细胞肿胀更加明显,且出现明显的空泡变性;培养 72 h 后细胞体积明显增大,可见细胞凋亡碎片,出现细胞明显凋亡现象。见图 2。

2.3 ATRA 联合低剂量 Ara-C 对 ACC247 细胞增殖的影响

ATRA 联合低剂量 Ara-C 作用于 ACC247 细

胞后,其抑制率增加,且效果优于单用 ATRA 或 Ara-C,差异有统计学意义(20.8% : 6.8% : 12.0%, $P < 0.05$);与 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 ATRA 联合低剂量 Ara-C 对 ACC247 细胞凋亡的影响

ATRA、低剂量 Ara-C 单独或联合作用于 ACC247 细胞 48 h 后,Annexin V-FITC/PI 双染测流式凋亡见图 3。

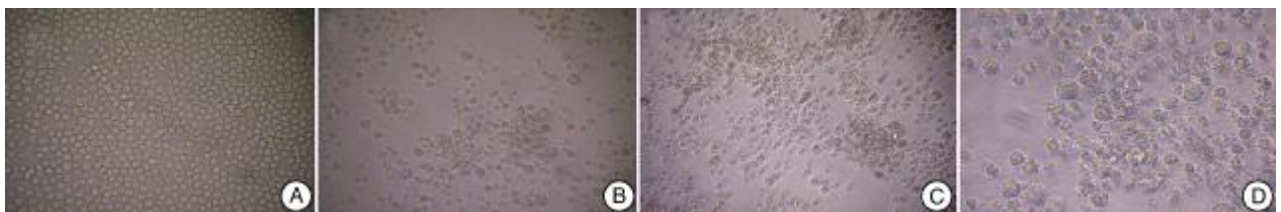
3 讨论

ATRA 主要是通过诱导白血病细胞向成熟细胞分化来实现其治疗作用的^[2]。虽然有研究发现 ATRA 也有促凋亡作用,但一般认为较弱,且发生较晚^[3]。Ara-C 是去氧胞苷类抗代谢药物,主要作用机制是通过抑制细胞 DNA 的合成,达到干扰细胞增殖的目的。Ara-C 作为治疗血液肿瘤(白血病及淋巴瘤)的首选药物之一,常与其他化疗药物联合应用。国内外学者在 Ara-C 抗白血病机制方面进行了许多研究,诱导白血病细胞凋亡可能是其主要作用机制之一。

众所周知,APL 是应用分化诱导剂 ATRA 治疗成功的第一个人类血液学恶性疾患。而其对于髓系的其他类型白血病效果不佳,如何将毒副作用小的 ATRA 用于除 APL 之外的髓系白血病,而又

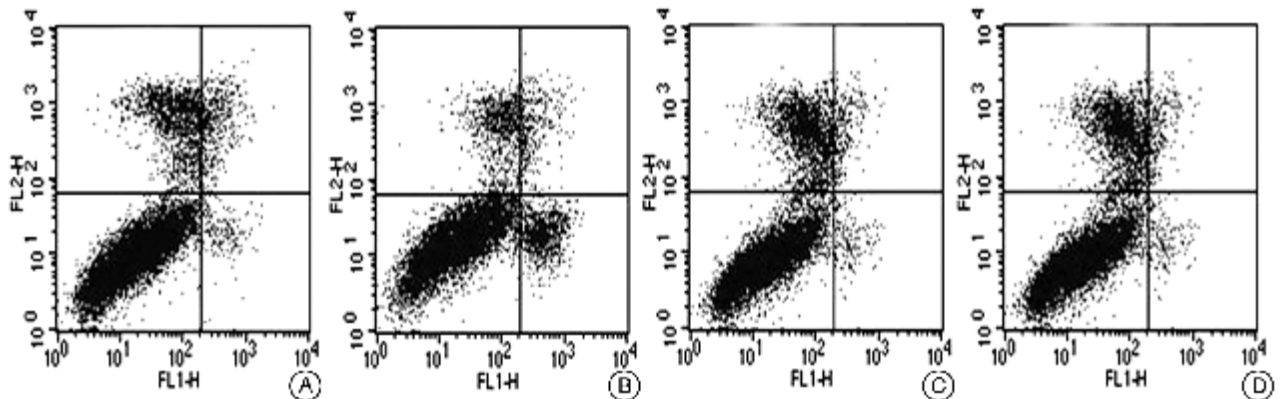
保证其效果,是一个有待探索的问题。 M_4 型白血病形态学上即有早幼粒系又有单核系异常增殖,而 ATRA 可诱导早幼粒细胞成熟,Ara-C 可抑制白血病细胞增殖,促进其凋亡。临床上多采用大剂量化疗药物治疗 M_4 型白血病,对身体其他脏器损害严重,而本研究将 ATRA 和低剂量 Ara-C 联合作用于白血病细胞株 ACC247(M_4 型白血病),期望在 ATRA 基础上加用少量 Ara-C 达到与大剂量化疗相同或者更加良好的疗效,从而减轻大剂量化疗药物带来的脏器损害,优化治疗方案。

本研究将 ATRA 和低剂量 Ara-C 联合作用于白血病细胞株 ACC247(M_4 型白血病),形态学上发现随着联合作用时间的延长,ACC247 细胞出现细胞核增大、分叶,同时细胞肿胀,出现空泡、核固缩等征象,与流式细胞仪定量观察到的促凋亡作用是一致的。由于从形态学上很难对联合用药和单药作用的效果做出客观的比较,故本研究未进行单药作用的形态学观察。联合用药可以明显抑制 ACC247 细胞的增殖,具有促凋亡作用,且存在明显的时效关系。同时,联合用药的效果优于单用 Ara-C 的促凋亡作用以及单用 ATRA 的促分化作用,提示二者联合应用并不是各自促凋亡和促分化作用简单的相加,而是存在相互作用、相互影响的情况。联合应用 ATRA 和 Ara-C 对急性粒-单核



A:空白对照组($\times 200$);B:二者联合作用 24 h($\times 200$);C:二者联合作用 48 h($\times 200$);D:二者联合作用 72 h($\times 400$)。

图2 ATRA、低剂量 Ara-C 联合应用对 ACC247 细胞形态学影响



A:0.05 $\mu\text{mol/L}$ Ara-C 组,凋亡率为(14.67 $\pm$ 1.73)%;B:1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组,凋亡率为(6.70 $\pm$ 4.10)%;C:1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 联合 0.05 $\mu\text{mol/L}$ Ara-C 组,凋亡率为(19.70 $\pm$ 7.65)%;D:空白对照组,凋亡率为(5.10 $\pm$ 2.16)%。

图3 Annexin V-FITC/PI 双染测流式凋亡图

增生。亦有研究表明 R-S 细胞中存在 Ig κ 基因重排。7 例 NK/T 淋巴瘤、白血病患者送检的 9 份标本,亦均未检测到 Ig/TCR 重排。这是因为 TCR γ 、TCR δ 基因重排在 NK 系统恶性疾病中几乎不表达,而 TCR β 仅在 0~7% NK 系统恶性肿瘤中表达。有报道称在急性髓系白血病中存在 Ig/TCR 重排,且这种重排现象是白血病预后差的独立危险因素。本中心仅 2 例双表型白血病患者出现受体基因重排。BIOMED-2 多重 PCR 淋巴细胞克隆谱系分析仅需要少量 DNA 即可达到检测目标,这使 PCR 技术运用细胞病变残留成为可能。骨髓/外周血 Ig/TCR 重排是评估淋巴瘤骨髓浸润或急性(慢性)淋巴细胞白血病临床疗效及监控其疾病进展的重要依据^[2-3]。正规化疗的淋巴瘤或淋系白血病患者在第 1 个疗程后 Ig/TCR 重排基本可以转阴,这提示肿瘤负荷降至 5% 以下。而一些高危型患者 1 个疗程无法达到转阴,预后基本不良。其中 1 例外周血检查无明显变化的观察期 CLL 患者抗原受体基因转为阳性,提示肿瘤负荷增加,为积极治疗提供依据。在 88 份受体基因重排阳性的患者中,有 15 份标本来源于复发患者,且这 15 例患者均无明显临床表现,这为下一步治疗争取了时间并为调整治疗方案提供依据。此外自体移植前送检外周血干细胞 Ig/TCR 重排检测,可以检测是否达到清髓标准,这直接影响着自体移植效果。

B/T 淋巴细胞受体基因重排与肿瘤的发生是 2 个独立过程,单克隆性增殖并非等同于恶性疾病,也可出现在病毒感染(如 EB、CMV、HIV 等)、自身免疫性疾病、免疫缺陷者以及骨髓移植或化疗后的患者,而且正常老年人也可因 TCR 库多样性衰竭而呈单克隆性重排。但一般而言,淋巴组织良性增殖表现为抗原受体基因重排的多克隆性,但也不能排除一些特殊情况^[4]。

综上所述,BIOMED-2 多重聚合酶链反应检测

Ig/TCR 受体基因重排已逐渐成为临床常规检测技术,对怀疑淋巴细胞增殖性疾病的诊断、鉴别诊断及治疗后疗效评估都具有重要的辅助作用^[5]。但临床工作无法单一使用一种实验技术,这就要求临床医生结合形态学、免疫表型、遗传学特征和临床表现个体化分析每个病理特征以达到明确诊断的目的,减少误诊及漏诊。

参考文献

- [1] van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, et al. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936[J]. *Leukemia*, 2007, 21:201-206.
- [2] Garand R, Beldjord K, Cavé H, et al. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL [J]. *Leukemia*, 2013, 27:370-376.
- [3] Pott C, Brüggemann M, Ritgen M, et al. MRD detection in B-cell non-Hodgkin lymphomas using Ig gene rearrangements and chromosomal translocations as targets for real-time quantitative PCR [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 971:175-200.
- [4] Shin S, Kim AH, Park J, et al. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangement in the bone marrow of lymphoid neoplasia using BIOMED-2 multiplex polymerase chain reaction [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10:1510-1517.
- [5] Boone E, Verhaaf B, Langerak AW. PCR-based analysis of rearranged immunoglobulin or T-cell receptor genes by GeneScan analysis or heteroduplex analysis for clonality assessment in lymphoma diagnostics [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 971:65-91.

(收稿日期:2014-03-16)

(上接第 203 页)

细胞白血病产生相互作用的机制,目前尚未清楚,还需继续研究。本实验目前处于探索阶段,对于 ATRA 联合更低浓度的 Ara-C 是否有更好的作用效果,还需进一步探索。

总之,ATRA 联合低剂量 Ara-C 对 ACC247 细胞株的作用优于单用 ATRA 或 Ara-C。因此,ATRA 联合低剂量 Ara-C 在不影响药物作用效果的同时,尽量减轻化疗对身体各脏器的不良反应,可以作为临床治疗白血病研究的一个新方向,值得

进一步探索。

参考文献

- [1] Evans T. Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33:1055-1061.
- [2] 卢立志,王文英. 全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病现状及相关若干问题 [J]. *现代诊断与治疗*, 2005, 16(2):127-128.
- [3] 许培权,龚建平. 全反式维甲酸对 HL-60 细胞分化和凋亡的影响 [J]. *癌症*, 2004, 23(2):118-123.

(收稿日期:2014-08-21)