

高三尖杉酯碱联合 survivin 抑制剂 YM155 对人白血病 K562 细胞系增殖和凋亡的影响*

封蔚莹¹ 周炀¹ 刘忠民¹

【摘要】 目的:探讨高三尖杉酯碱(HHT)联合 survivin 抑制剂 YM155 对人白血病 K562 细胞系增殖抑制和诱导凋亡的作用及机制。**方法:**CCK 法检测细胞增殖抑制率,依据中效原理及 CalcuSyn 软件评价 HHT 和 YM155 的联合治疗效果。设空白对照组、HHT 组、YM155 组和联合用药组,采用 Annexin V/PI 双染法以流式细胞仪检测细胞凋亡率,Western blot 法检测 survivin 蛋白变化,以特异性荧光底物检测 caspase-3、-8 活性变化。**结果:**HHT 和 YM155 单药均以浓度依赖方式抑制 K562 细胞生长,二者联合应用具有化疗协同作用(CI<1)。联合用药组 K562 细胞凋亡率明显高于单独用药组,且 survivin 蛋白表达显著下调(均 $P<0.05$)。HHT 单药及联合用药组诱导 caspase-3、-8 活化,而 YM155 单药未引起 caspase-3、-8 活性变化。**结论:**HHT 和 YM155 联合应用于 K562 细胞具有化疗协同作用,通过下调 survivin 诱导 K562 细胞凋亡。

【关键词】 高三尖杉酯碱;YM155;K562 细胞

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2015.03.007

【中图分类号】 R733.7 **【文献标志码】** A

Effects of homharringtonine plus survivin inhibitor YM155 on the proliferation and apoptosis of human leukemia cell line K562

FENG Weiyong ZHOU Yang LIU Zhongmin

(Department of Hematology, Shaoxing People's Hospital, Shaoxing Hospital of Zhejiang University, Shaoxing, 312000, China)

Corresponding author: FENG Weiyong, E-mail: 68471104@qq.com

Abstract Objectives: To explore the combination applications of homharringtonine (HHT) and the survivin inhibitor YM155 on the proliferation and apoptosis of human leukemia cell line K562 and its mechanism. **Methods:** CCK-8 assay was used to determine the growth inhibition. The combination index CI of HHT and YM155 was calculated using the Chou-talalay methods by CalcuSyn software. The cells were divided into 4 groups: control group, HHT group, YM155 group, and combination group. The cell apoptosis rates were evaluated by flow cytometry. The expressions of associated proteins were detected by Western blot. Caspase-3 and -8 activities were determined using the specific fluorogenic substrates. **Results:** The inhibitory rates on cell growth by HHT and YM155 alone increased in concentration-dependent manner. The application of HHT and YM155 had synergistic effect ($CI<1$). The apoptosis rate was higher in combination group than those of one drug group and the protein expression levels of survivin decreased remarkably in combination group ($P<0.05$). Caspase-3 and -8 were activated by HHT or combination treatment, but not by YM155. **Conclusion:** The combination treatment with HHT and YM155 on K562 cells has synergistic effect. The mechanism is related to the apoptosis induced through down-regulation of survivin.

Key words homharringtonine; YM155; K562 cells

高三尖杉酯碱(HHT)是从我国粗榧属植物中分离出的一种抗肿瘤生物碱,临床证明其对各种急性白血病均有较好疗效。在伊马替尼问世之前, HHT 为主的联合化疗方案是慢性粒细胞白血病

(CML)加速及急变期患者有效的治疗措施,此后伊马替尼等酪氨酸激酶抑制剂应用于 CML 治疗,由于该系列药物不能杀灭白血病性造血干细胞和出现耐药性, HHT 联合化疗又逐步受到重视。本研究旨在探讨 HHT 联合 survivin 抑制剂 YM155 对人 CML 急变期 K562 细胞系的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 药物和主要试剂

HHT(杭州民生药业有限公司),溶于 RPMI

* 基金项目:浙江省中医药科技计划项目(No:2012ZB159);绍兴市公益性应用计划项目(No:2012B70066)

¹ 绍兴市人民医院 浙江大学绍兴医院血液科(浙江绍兴, 312000)

通信作者:封蔚莹, E-mail: 68471104@qq.com

保存于 4℃。YM155 (美国 Selleck Chemicals 公司), 溶于 DMSO 液以 1 mmol/L 浓度分装, -20℃ 保存。RPMI1640 培养液及胎牛血清购于美国 Sigma 公司。Annexin V/PI 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司, CCK-8 试剂盒购自上海前尘生物科技有限公司。Survivin 兔抗人多克隆抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG 购于英国 GE 公司, 兔抗人 B-actin 克隆抗体购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞系及培养

CML 急变期 K562 细胞系购自中国科学院上海细胞生物研究所, 于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 在 37℃、5% CO₂、饱和湿度孵育箱内培养, 2~3 d 传代 1 次, 锥虫蓝拒染法测定细胞活力, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 CCK 法细胞增殖检测

用 CCK-8 活性检测试剂盒, 按照说明书操作, 以酶标仪检测 A450 处吸光度, 以 $A450[(\text{作用组} - \text{空白组}) / (\text{正常组} - \text{空白组})] \times 100\%$ 的值为细胞存活率, “1 - 细胞存活率”为药物作用抑制率。分别选择不同浓度梯度的 HHT 和 YM155 单药治疗 K562 细胞, 确定两单药 48 h 的 IC₅₀ 值。

1.4 HHT 与 YM155 对 K562 细胞联合治疗

取对数生长期 K562 细胞, 以 1×10^5 /ml 细胞的密度接种于无菌 24 孔板, 孵育 24 h 后开始实验。根据两单药的 IC₅₀ 值, 选择不同浓度梯度的 HHT 与 YM155 联合治疗 K562 细胞, 以 CCK 法计算增殖抑制率, 应用 Chou-Talalay 中效原理, 采用 CalcuSyn 软件计算两药联合指数 (CI), 并评价联合作用效应 (CI < 1 时, 两药为协同作用; CI = 1 时, 为相加作用; CI > 1 时, 为拮抗作用)。

1.5 HHT 与 YM155 对 K562 细胞联合治疗机制研究

选择前述确定的 YM155 + HHT 最佳联合作用药物浓度及作用时间点, 设立 4 组: 空白细胞组、HHT 组、YM155 组、HHT + YM155 联合用药组, 分别检测 4 组的凋亡情况变化。具体如下: 采用流式细胞仪 Annexin V/PI 双染法确定药物对 K562 细胞的凋亡率变化, 采用 Western blot 法检测 K562 细胞凋亡相关蛋白 (survivin), 以特异性荧光底物检测 K562 细胞 caspase-3、-8 活性变化, 具体操作方法参见文献 [1]、[2]。以图表形式结合统计学方法进行 4 组比较研究, 初步确定 YM155 + HHT 联合治疗作用机制。

1.6 统计学处理

所有实验均至少重复 3 遍。采用 SPSS17.0 软件分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间均数比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HHT 和 YM155 单药对 K562 细胞增殖的影响

CCK-8 法结果显示, 以不同浓度梯度的 HHT 或 YM155 单药作用于 K562 细胞, 两种药物均以浓度依赖方式抑制 K562 细胞生长, 48 h 的 IC₅₀ 分别为 57.2 ng/ml 和 3.5 ng/ml。

2.2 HHT 和 YM155 联合用药对 K562 细胞增殖的影响

根据上述两单药的 IC₅₀ 值, 选取 HHT 浓度梯度为 2.5、5、10、20、40、80 ng/ml, YM155 浓度梯度为 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 ng/ml。2 种药物以 12.5 : 1.0 的固定浓度比例一对一组合进行联合治疗, 如 2.5 ng/ml HHT + 0.2 ng/ml YM155, 依次类推, 以 CCK 法观察药物作用于 K562 细胞 48 h 后各组增殖抑制率, 应用 CalcuSyn 软件计算 CI 值。结果显示, 两种药物联合应用 CI 值 < 1, 为协同作用 (图 1)。

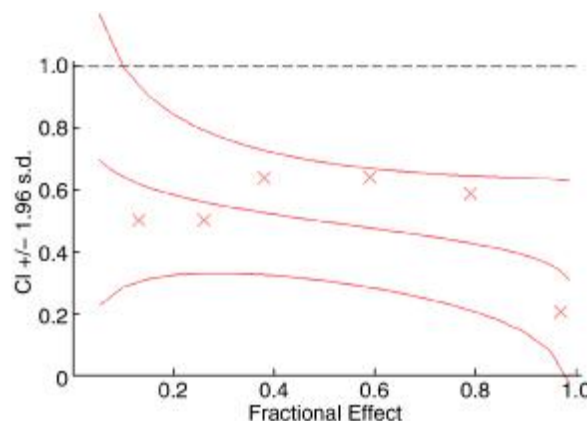


图 1 HHT 和 YM155 联合应用对 K562 细胞的增殖抑制协同作用

2.3 HHT 和 YM155 联合用药对 K562 细胞的作用机制研究

根据上述研究, 设立空白对照组、80 ng/ml HHT 组、6.4 ng/ml YM155 组、80 ng/ml HHT + 6.4 ng/ml YM155 联合用药组。Annexin V/PI 双染法结果显示, 与空白对照组比较, 药物作用 48 h 后 K562 细胞凋亡增加, 联合用药组的凋亡率 (43.4%) 明显大于 HHT 组 (12.9%) 和 YM155 组 (11.3%)。仍取药物作用 48 h 时间点, 采用 Western blot 法检测 survivin 蛋白的变化, survivin 蛋白在联合用药组明显下调, 见图 2。与对空白对照组比较, HHT 和联合用药组能诱导 caspase-3、-8 活化, 但 YM155 单药并未引起 caspase-3、-8 活性变化, 见图 3。

3 讨论

HHT 是从我国粗榧属植物中分离的生物碱,

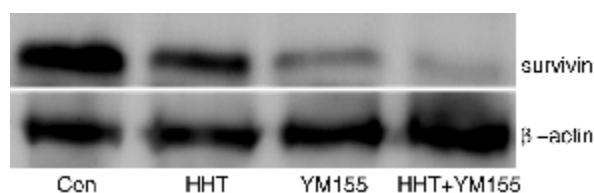


图2 HHT和YM155联合用药对K562细胞 survivin 蛋白表达影响

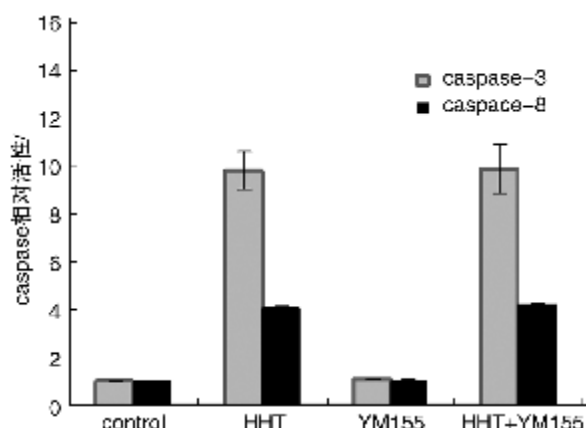


图3 HHT和YM155单药及联合用药对K562细胞 caspase-3、-8 活性影响

对 G_1 和 G_2 期细胞杀伤作用最强,属细胞周期特异性药物。CML 晚期急变患者临床疗效欠佳,寻找最佳的联合化疗方案是未来研究方向。从肿瘤细胞代谢学角度,设想 HHT 和细胞周期非特异性药物联合应用能更大程度地杀灭白血病细胞。目前认为 YM155 为 survivin 抑制剂,是细胞周期非特异性药物^[3],与癌细胞 ILF3 转录因子结合于 survivin 基因启动子阻止 survivin 基因转录,下调 survivin 蛋白表达诱导肿瘤细胞凋亡^[4]。

我们前期研究已发现 YM155 单药具有明显抑制急性髓系白血病 HL-60 和 U937 细胞生长及诱导凋亡的效应^[5],迄今为止尚无 YM155 对 CML K562 细胞系的作用机制以及联合治疗研究。故我们设计 HHT 与 YM155 对 K562 细胞系的联合治疗,发现其具有显著抑制 K562 细胞系增殖的协同作用,且在 80 ng/ml HHT+6.4 ng/ml YM155 组联合治疗时具有更低的 CI 值,提示二者具有更强的协同效应,因此后续以此浓度开展协同作用机制研究。本研究发现联合用药组凋亡率明显增加,伴随 survivin 蛋白表达下降。目前国内外研究认为 YM155 的作用机制除抑制 survivin 外,尚可通过下调 Mcl-1 和 EGFR 发挥诱导凋亡作用,以及诱导自噬等多种作用^[6-8]。我们首次发现 YM155 未通过激活 K562 细胞 caspase-3、-8 诱导细胞凋亡,这与其对 HL-60 细胞的研究结果并不一致,故 YM155 可能具有肿瘤细胞特异性,或许是多靶点

作用药物。已知细胞除可以通过内源性和外源性途径诱导凋亡外,尚可以通过 AIF(凋亡诱导因子)来实现凋亡,故 YM155 有可能是通过不依赖 caspase 的途径诱导凋亡,或者存在自噬等其他途径的细胞死亡,有待未来进一步研究。

目前已有 YM155 对部分实体瘤细胞系联合治疗的研究报道^[9-10],同时在实体瘤和淋巴瘤的 II 期临床研究发现单药作用疗效有限,建议开展联合治疗研究^[11-12]。我们的研究是首次将 YM155 用于对 CML 细胞系的联合治疗,揭示其与 HHT 具有显著协同效应,为 CML 急变期患者寻找经济、低毒、高效的治疗方案开辟新思路。

参考文献

- [1] 封蔚莹,周炀,钟永根,等. SN-38 对 K562 细胞的增殖抑制、凋亡诱导及其与塞来昔布联合化疗的协同作用[J]. 华中科技大学学报(医学版),2012,41(2):156-160.
- [2] 封蔚莹,周炀,周国忠. Survivin 反义寡核苷酸诱导 K562 细胞凋亡及化疗协同作用研究[J]. 临床血液学杂志,2012,25(7):454-456.
- [3] Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, et al. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts[J]. Cancer Res, 2007, 67: 8014-8021.
- [4] Yamauchi T, Nakamura N, Hiramoto M, et al. Sepantronium bromide (YM155) induces disruption of the ILF3/p54 (nrb) complex, which is required for survivin expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425: 711-716.
- [5] Feng W, Yoshida A, Ueda T. YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 435: 52-57.
- [6] Tang H, Shao H, Yu C, et al. Mcl-1 downregulation by YM155 contributes to its synergistic anti-tumor activities with ABT-263[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82: 1066-1072.
- [7] Na YS, Yang SJ, Kim SM, et al. YM155 induces EGFR suppression in pancreatic cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7: e38625.
- [8] Wang YF, Zhang W, HE KF, et al. Induction of autophagy-dependent cell death by the survivin suppressant YM155 in salivary adenoid cystic carcinoma[J]. Apoptosis, 2014, 19: 748-758.
- [9] Kaneko N, Mitsuoka K, Amino N, et al. Combination of YM155, a survivin suppressant, with bendamustine and rituximab: a new combination therapy to treat relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20: 1814-1822.

正常,头颅 MRI+增强 MRV 未见异常,无皮质下白质脑水肿、无出血、梗死、静脉窦血栓形成等影像学改变,不支持可逆性后部白质脑病综合征或脑血管疾病。脑脊液压力不高,白细胞数正常,未见幼稚细胞,细菌培养阴性,EB 病毒、CMV 病毒 DNA 定量阴性,可除外中枢神经系统白血病及中枢神经系统感染。其脑脊液蛋白偏高而白细胞数正常,符合蛋白-细胞分离现象。肌电图检查示 F 波反射延迟,神经传导速度减慢,符合 GBS 实验室检查的特点。因此,该患者 allo-HSCT 并发 GBS 可确诊。

allo-HSCT 并发 GBS 病因不明,有报道可能与预处理方案、CMV 感染后快速免疫重建失衡有关,还有报道可能由 aGVHD 诱发^[12-14]。本例患者 allo-HSCT 后曾发生 aGVHD,治疗后得到控制。起病前 1 个月有 EB 病毒血症,虽经美罗华治疗后 EB 病毒 DNA 定量转为阴性,仍不排除 EB 病毒为 GBS 前驱感染的可能,也不除外 aGVHD 诱发。

确诊 GBS 后,给予 IVIG 联合常规剂量糖皮质激素治疗,患者病情逐渐好转并恢复正常,至今未再出现神经系统症状。提示 allo-HSCT 后并发 GBS 及时给予 IVIG 联合常规剂量糖皮质激素免疫抑制治疗,可能得到治愈。

综上所述,GBS 是 allo-HSCT 的罕见并发症,其发病机制未明,可能与预处理方案、病毒感染后快速免疫重建失衡有关,也有报道由 aGVHD 诱发。亚急性起病,以四肢对称性迟缓性瘫痪、末梢型感觉障碍为主要临床表现。除临床表现外,脑脊液检查蛋白-细胞分离及神经电生理检查脱髓鞘病变的特点是其诊断的主要依据。完善影像学、脑脊液相关检测可协助与其他神经系统并发症相鉴别。IVIG 疗效显著,早期诊断和及时治疗一般预后良好。

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会神经肌肉病学组,中华医学会神经病学分会肌电图及临床神经电生理学组,中华医学会神经病学分会神经免疫学组. 中国吉兰-巴雷综合征诊治指南[J]. 中华神经科杂志,2010,43(8): 583-586.
- [2] 陈莉,王健民,冯曹波,等. 异基因外周血造血干细胞移植后并发格林-巴利综合征 1 例[J]. 临床血液学杂志,2008,21(5):277-278.
- [3] Fujisaki G,Kami M,Murashige N,et al. Guillain-Barre syndrome associated with rapid immune reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant,2006,37:617-619.
- [4] Rodriguez V,Kuehnle I,Heslop HE,et al. Guillain-Barre syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Bone Marrow Transplant,2002,29:515-517.
- [5] 吴强强,孙黎飞. 格林巴利综合征相关研究近况[J]. 实用医药杂志,2010,27(7):651-653.
- [6] Hughes RA,Cornblath DR. Guillain-Barre syndrome [J]. Lancet,2005,366:1653-1666.
- [7] Walling AD,Dickson G. Guillain-Barre syndrome [J]. Am Fam Physician,2013,87:191-197.
- [8] 卢媛,高明,王霞. 血浆置换在极重型格林-巴利综合征治疗中的应用[J]. 中国输血杂志,2012,25(7):672-673.
- [9] Shahrizaila N,Yuki N. The role of immunotherapy in Guillain-Barré syndrome: understanding the mechanism of action[J]. Expert Opin Pharmacother,2011,12:1551-1560.
- [10] Hughes RA,Swan AV, Van Doorn PA. Corticosteroids for Guillain-Barré syndrome[J]. Cochrane Database Syst Rev,2010,17:CD001446.
- [11] Rajabally YA. Treatment of Guillain-Barre syndrome: a review[J]. Inflamm Allergy Drug Targets,2012,11:330-334.
- [12] Nasilowska-Adamska B,Lysiak Z,Halaburda K,et al. Guillain-Barre syndrome pathological connection with GvHD after allogeneic bone marrow transplantation [J]. Ann Transplant,2006,11:10-11.
- [13] Barba P,Pinana JL,Valcarcel D,et al. Early and late neurological complications after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant,2009,15:1439-1446.
- [14] Hernandez-Boluda JC,Lis MJ,Gotteris R,et al. Guillain-Barre syndrome associated with cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Transpl Infect Dis,2005,7:93-96.

(收稿日期:2014-07-14)

(上接第 211 页)

- [10] Kaneko N,Kita A,Yamanaka K,et al. Combination of YM155,a survivin suppressant with a STAT3 inhibitor;a new strategy to treat diffuse large B-cell lymphoma[J]. Leuk Res,2013,37:1156-1161.
- [11] Kelly RJ,Thomas A,Rajan A,et al. A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155,survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with

advanced non-small-cell lung cancer[J]. Ann Oncol,2013,24:2601-2606.

- [12] Cheson BD,Bartlett NL,Vose JM,et al. A phase II study of the survivin suppressant YM155 in patients with refractory diffuse large B-cell lymphoma [J]. Cancer,2012,118:3128-3134.

(收稿日期:2014-08-13)