

• 实验研究 •

川芎嗪联合三氧化二砷对人急性早幼粒细胞白血病 HL-60 细胞增殖的影响

伍俞霓 徐酉华* 沈亚莉 胡田田 王翠翠 郭改丽

重庆医科大学附属儿童医院, 重庆市渝中区中山二路 136 号, 400014)

* 通讯作者: lc198371@126.com, 13983057566

[摘要] 目的 探讨川芎嗪(TMP)联合三氧化二砷(As_2O_3)对人急性早幼粒细胞白血病(APL)细胞株 HL-60 增殖的影响及其治疗 APL 的作用机制。方法 采用 HL-60 和脐带内皮细胞系 ECV-304 两种细胞株,分为空白组、TMP 组、 As_2O_3 组、TMP+ As_2O_3 组,每组设 4 个复孔,经 TMP 单独或联合 As_2O_3 作用后,应用噻唑蓝(MTT)实验测定 HL-60 细胞增殖变化;检测 HL-60 细胞血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 和蛋白表达;台盼蓝染色计数绘制 ECV-304 细胞生长曲线;流式细胞仪检测 ECV-304 细胞早期凋亡率;倒置显微镜观察 ECV-304 细胞贴壁情况。结果 TMP 能明显抑制 HL-60、ECV-304 细胞增殖,且能加强 As_2O_3 抑制增殖的作用;VEGF mRNA 和蛋白表达在 TMP 与 As_2O_3 联合处理后明显减少;TMP 与 As_2O_3 均能诱导 ECV-304 细胞早期凋亡,降低细胞贴壁能力,联合作用后效果均明显增强。结论 TMP 联合 As_2O_3 抑制 APL HL-60 细胞增殖作用增强,抗血管新生是其治疗 APL 的可能机制。

[关键词] 川芎嗪;急性早幼粒细胞白血病;细胞增殖;HL-60 细胞;抗血管新生;三氧化二砷

Effect of Tetramethylpyrazine Combined with Arsenic Trioxide on the Proliferation of Cell Line HL-60 in Human Promyelocytic Leukemia

WU Yuni, XU Youhua, SHEN Yali, HU Tiantian, WANG Cuicui, GUO Gaili

(Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400014)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect and its mechanism of tetramethylpyrazine (TMP) alone or combined with arsenic trioxide (As_2O_3) on the proliferation of cell line HL-60 in human promyelocytic leukemia (APL). **Methods** The cell line HL-60 and ECV-304 were adopted and randomized into the blank group, TMP group, As_2O_3 group and TMP combined with As_2O_3 group. Four wells were established in each group. Methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) was used to detect the proliferation of cell line HL-60. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA was detected as well. Trypan blue staining method was used to draw the growth curve of cell line ECV-304. The early apoptosis rate of cell line ECV-304 was detected by flow cytometry. The adhesion degree of cell line ECV-304 was observed by inverted microscope. **Results** TMP could inhibit the proliferation of cell line HL-60 and ECV-304 and strengthen the effect of As_2O_3 . The expression of VEGF mRNA and protein was significantly decreased after the combined treatment. Both TMP and As_2O_3 could induce the early apoptosis of cell line ECV-304 and reduce the ability of cell adhesion, and the combined treatment could strengthen the effect. **Conclusion** The combination of TMP and As_2O_3 has a synergistic effect on inhibiting cell proliferation. It is initially confirmed that anti-angiogenesis is the therapeutic mechanism for APL.

Keywords tetramethylpyrazine (TMP); human promyelocytic leukemia; proliferation; HL-60 cell; anti-angiogenesis; arsenic trioxide

三氧化二砷(As_2O_3)可使初治的急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)患者有较高的完全缓解率,对全反式甲酸(ATRA)耐受的复发患者也有良好的治疗作用^[1]。 As_2O_3 治疗 APL 的疗效具有浓度依赖性,致副作用凸显,为了克服该问题,减毒增敏剂应运而生。目前,研究较多的减毒增敏剂有蛋白酶体抑制剂、细胞因子及中药提取物如丹参酮、鼠尾草酸、人参皂苷^[2]等,而中药

川芎嗪(Tetramethylpyrazine, TMP)是从川芎根茎中提取的有效成分,其逆转肿瘤多药耐药及抗白血病细胞增殖作用已在许多研究中得到证实^[3]。本实验观察 TMP 联合 As_2O_3 对 APL 细胞株 HL-60 细胞的杀伤作用,并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、细胞培养及主要试剂

HL-60 细胞、ECV-304 细胞(重庆医科大学儿

科研究所传代保存), Trizol 和逆转录 PCR 其他相关试剂(TaKaRa 公司, 日本), 流式细胞仪(BD 公司, 美国)。HL-60 培养在含 10% 优级胎牛血清、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素、pH7.4 的 RPMI1640 培养基中, ECV-304 培养在 DMEM 高糖培养基中。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内。

1.2 药物

盐酸 TMP 注射液, 上海现代哈森药业有限公司生产, 批号 1009052。注射用 As₂O₃, 北京双鹭药业股份有限公司生产, 批号 20110401。

1.3 细胞增殖活性测定

1.3.1 TMP 对 HL-60 细胞增殖活性的影响 实验组加入用 RPMI 1640 完全培养基稀释的不同浓度的 TMP 液, 终浓度分别为 100、200、300、400、600、800、1000 μg/ml; 正常组和空白组加入 RPMI 1640。每组设 4 个复孔。分别于 24h、48h、60h、72h 加入 MTT。培养 4h 后加入 150 μl DMSO。酶标仪 630nm 波长测定其吸光值(optical density, OD), 计算细胞生长抑制率。生长抑制率 = (正常组 OD₆₃₀ 值 - 实验组 OD₆₃₀ 值) / (正常组 OD₆₃₀ 值 - 空白组 OD₆₃₀ 值)。

1.3.2 TMP 联合 As₂O₃ 对 HL-60 细胞增殖活性的影响 TMP(终浓度 1000 μg/ml) 和(或) As₂O₃ (终浓度 4 μmol/L) 200 μl, 接种于 96 孔板中, 调整细胞悬液密度为 2 × 10⁵/ml; 余同前。

1.4 血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 表达的检测

收集 TMP(终浓度 1000 μg/ml) 和(或) As₂O₃ (终浓度 4 μmol/L) 处理 72h 的 HL-60 细胞(约 1 × 10⁷ 个细胞), 用 PBS 洗涤 1 次。Trizol 法提取细胞总 RNA, 测纯度及含量。引物序列: Forward: 5'-GAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC-3', Reverse: 5'-CGATCGTTCTGTATCAGTCTTCC-3'; 产物为 408bp 和 541bp; 退火温度为 55℃。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5min; 随后 94℃ 变性 1min, 退火 1min, 72℃ 延伸 90s, 35 个循环; 72℃ 延伸 7min。设立 β-actin 内参。产物经琼脂糖凝胶电泳, 紫外照相, 凝胶图像分析, 计算目的基因/β-actin 比值。

1.5 细胞培养上清 VEGF 水平的检测

TMP(终浓度 1000 μg/ml) 和(或) As₂O₃ (终浓度 4 μmol/L) 培养 HL-60 细胞 24h、48h、72h 后, 收获上清, -20℃ 保存。采用酶联免疫试剂盒 ELISA 双夹心法, 按试剂盒说明书进行检测。450nm 波长测定其 OD 值, 绘制浓度与 OD 值关系曲线, 计算本

本的 VEGF 浓度。

1.6 细胞培养上清对 ECV-304 细胞体外增殖的影响

1.6.1 细胞培养上清的制备 含 TMP(终浓度 1000 μg/ml) 和(或) As₂O₃ (终浓度 4 μmol/L) 200 μl 的 RPMI1640 培养基 5ml, 调整 HL-60 细胞密度为 1 × 10⁵/ml, 培养 24h 后, 收获上清, -20℃ 保存。

1.6.2 ECV-304 细胞生长抑制率测定 消化 ECV-304 细胞呈单个细胞悬液, 除 RPMI1640 培养基做对照外, 分别换以用含各组细胞培养上清的体积分数为 25% 的 RPMI1640 培养基中, 总体积 5ml, 于加药后 24h、48h、72h 取各组细胞, 台盼蓝染色后记数, 计算生长抑制率。

生长抑制率 = (阴性对照组活细胞数 - 实验组活细胞数) / 阴性对照组活细胞数 × 100%

1.7 ECV-304 细胞早期凋亡和黏附能力的观察

TMP(终浓度 1000 μg/ml) 和(或) As₂O₃ (终浓度 4 μmol/L) 作用 ECV-304 细胞 72h 后, 消化细胞, PBS 离心洗涤, 按试剂盒使用说明, 在细胞悬液中加入 AnnexinV-FITC, 用流式细胞仪测定 AnnexinV 表达。在已经贴壁 80% 的 ECV-304 细胞中用 TMP(终浓度 1000 μg/ml) 和(或) As₂O₃ (终浓度 4 μmol/L) 处理 72h, 观察细胞贴壁情况, 倒置显微镜下摄像。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用组间方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度 TMP 对 HL-60 细胞增殖的影响

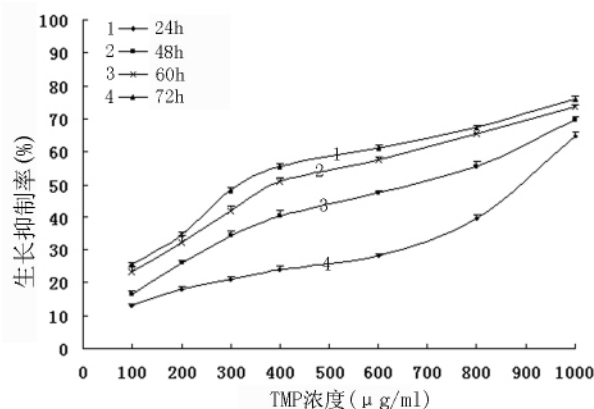


图1 TMP 对 HL-60 细胞的生长抑制作用

图 1 示, 当 TMP 浓度 < 200 μg/ml 时, 细胞生长抑制率 < 50%, TMP 对细胞的生长抑制作用呈剂量和时间依赖关系, 各处理组与正常组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 TMP 联合 As₂O₃ 对 HL-60 细胞增殖的影响

表 1 示, TMP+As₂O₃ 组在 48h、72h 的生长抑制率均高于 TMP 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), As₂O₃ 组在 24h、48h、72h 的生长抑制率均低于 TMP 组($P<0.01$)。

表 1 TMP 联合 As₂O₃ 对 HL-60 细胞增殖的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	24h	48h	72h
TMP 组	4	0.76±0.01	0.77±0.01	0.78±0.02
As ₂ O ₃ 组	4	0.05±0.01**	0.28±0.05**	0.53±0.03**
TMP+As ₂ O ₃ 组	4	0.78±0.01	0.85±0.02*	0.89±0.01**

注:与 TMP 组同时时间点比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.3 TMP 联合 As₂O₃ 对 HL-60 细胞表达 VEGF mRNA 和蛋白分泌的影响

表 2 示, 各组 VEGF 水平、VEGF₁ mRNA 相对灰度值、VEGF₂ mRNA 相对灰度值与空白组比较, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 细胞培养上清对 ECV-304 细胞增殖的影响

表 3 示, TMP+As₂O₃ 组对 ECV-304 细胞增殖的影响, 随着作用时间延长, 抑制率升高。与 TMP 组比较, TMP+As₂O₃ 组可显著提高对 ECV-304 细胞增殖的抑制率($P<0.05$)。TMP+As₂O₃ 组在 72h 的生长抑制率与 As₂O₃ 组和 TMP 组相比, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 TMP 联合 As₂O₃ 诱导 ECV-304 细胞凋亡的作用

用流式细胞仪检测 ECV-304 细胞的早期凋亡率, 结果显示 TMP 单独或联合 As₂O₃ 时均可诱导其早期凋亡, 在 TMP+As₂O₃ 组 ECV-304 细胞 72h 的早期凋亡率高达 42.3%。表 4 示, 各组 ECV-304 细胞凋亡率与空白组比较, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.6 TMP 联合 As₂O₃ 对 ECV-304 细胞贴壁的影响

图 2 示, ECV-304 细胞为贴壁细胞, 经 TMP 或 As₂O₃ 单独处理后, 能明显抑制 ECV-304 细胞的黏附能力。空白组贴壁细胞的密度大, 细胞触角贴壁

能力强, 故触角边缘在镜下观察不明显; 而在 TMP 组和 As₂O₃ 组, 贴壁细胞量减少, TMP+As₂O₃ 组数量减少更明显, 细胞触角贴壁能力也明显减弱, 触角形态镜下完整。

表 3 细胞培养上清对 ECV-304 细胞增殖的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	24h	48h	72h
TMP 组	4	10.90±1.37	14.80±1.23	20.13±2.24#
As ₂ O ₃ 组	4	4.27±0.65	7.30±0.98	10.60±1.61#
TMP+As ₂ O ₃ 组	4	20.67±1.91*	26.40±2.30*34.77±1.31*	

注:与 TMP 组同时时间点比较, * $P<0.05$; 与 TMP+As₂O₃ 组同时时间点比较, # $P<0.05$

表 4 TMP 联合 As₂O₃ 对 ECV-304 细胞凋亡率的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	凋亡率
空白组	4	6.54±0.46
TMP 组	4	26.19±1.57*
As ₂ O ₃ 组	4	22.11±1.68*
TMP+As ₂ O ₃ 组	4	42.23±1.58*

注:与空白组比较, * $P<0.01$

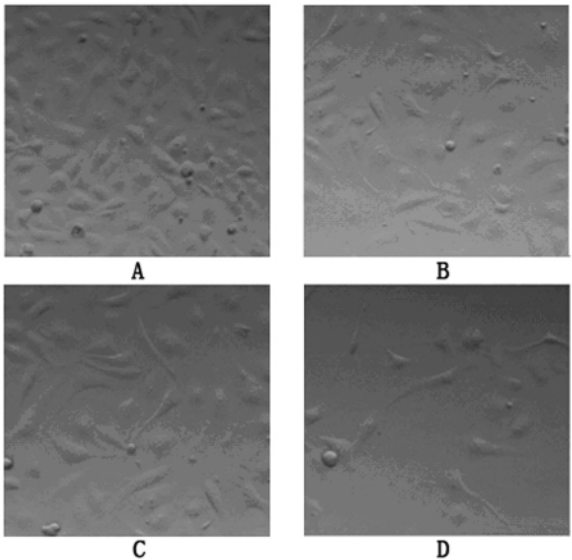


图 2 TMP 联合 As₂O₃ 对 ECV-304 细胞贴壁能力的影响 (注: A: 空白组 B: TMP 组 C: As₂O₃ 组 D: TMP+As₂O₃ 组)

表 2 TMP 联合 As₂O₃ 对 HL-60 细胞表达 VEGF mRNA 和蛋白分泌的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	VEGF1 mRNA 相对灰度值(%)	VEGF2 mRNA 相对灰度值(%)	VEGF 水平(pg/ml)
空白组	4	52.71±2.30	90.35±2.55	829.91±71.77
TMP 组	4	45.72±1.55*	63.41±2.12*	485.28±28.25*
As ₂ O ₃ 组	4	22.45±3.14*	38.37±3.06*	429.39±30.01*
TMP+As ₂ O ₃ 组	4	13.50±1.79*	18.74±2.05*	181.25±17.24*

注:与空白组比较, * $P<0.01$

3 讨论

As₂O₃ 能抑制 HL-60 细胞增殖,但它治疗 APL 引起的急性副反应,以及蓄积导致的慢性不良反应仍是临床难题,故减毒增敏剂的应用不可或缺。本研究发现,TMP 能抑制 HL-60 细胞增殖,呈剂量和时间依赖性,且能加强 As₂O₃ 抑制 HL-60 细胞增殖的作用。盐酸 TMP 注射液投入临床使用已 20 多年,使用途径多样,剂量自 40mg 至 2000mg,鲜有不良反应发生,安全范围大^[4]。TMP 有希望作为减毒增敏剂在与 As₂O₃ 联合治疗 APL 中发挥作用。

抗血管新生是 TMP 联合 As₂O₃ 治疗 APL 的机制之一。血管新生是指在原有血管基础上形成新的微小血管,抗血管新生治疗可通过阻断肿瘤细胞血供,有效阻止肿瘤的生长和转移。恶性血液病也存在血管新生亢进现象,在众多调节血管生成的因子中只有 VEGF 与微小血管密度(mircovessel density,MVD)相关^[5]。VEGF 参与 APL 发生、影响疗效及预后的机制包括自分泌和旁分泌途径。自分泌途径即白血病细胞分泌 VEGF 与自身细胞膜上受体 Flt-1 结合,抵抗凋亡。我们以 HL-60 细胞为研究对象,结果证实,TMP 与 As₂O₃ 联合作用后,VEGF mRNA 的合成和蛋白分泌都受到明显抑制,说明两者通过自分泌途径抑制血管新生,发挥抗肿瘤效应。旁分泌途径即 VEGF 可以高效特异性地作用于血管内皮细胞 KDR 受体,促进内皮细胞增殖。我们以 ECV-304 细胞作为研究对象,结果显示,TMP 与 As₂O₃ 均能诱导 ECV-304 细胞早期凋亡,降低细胞贴壁能力。TMP 和 As₂O₃ 联合应用,作用明显增强,提示两者可以通过阻断内皮细胞的增殖与转移,打断白血病细胞和内皮细胞之间交互刺激链。

白血病属于中医“髓劳”、“癥积”等病范畴,血瘀

证候起着重要作用,故活血化瘀法常应用于白血病治疗^[6]。川芎味辛,性温,归肝、胆、心包经,功效为活血行气、祛风止痛。然而活血化瘀药究竟是抑制还是加速血管新生,是目前尚有争议的问题。本实验证实,TMP 可以抑制 VEGF 介导的血管新生,抑制白血病细胞增殖,TMP 活血行气功能与抗肿瘤作用并不矛盾。

综上所述,本研究从 VEGF 自分泌和旁分泌两个途径着手,初步证实了抗血管新生是 TMP 单独或联合 As₂O₃ 治疗 APL 的机制,但还有待进一步研究。联合应用增强抑制增殖作用,使 TMP 有望成为 As₂O₃ 临床应用的减毒增敏剂,达到拓宽 As₂O₃ 临床应用的目的。

致谢:本研究得到儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地的支持,特此致谢!

参考文献

- [1]田锦林.三氧化二砷治疗复发性急性早幼粒细胞白血病临床观察[J].医学信息,2011,24(4):2165-2166.
- [2]王金良,孔佩艳,徐薇.人参皂甙 Rg3 抑制急性白血病骨髓基质细胞 HIF-1 α 及 VEGF 的表达及其机制探讨[J].第三军医大学学报,2010,32(7):621-624.
- [3]张伟,戴碧涛,汪明宇,等.川芎嗪对白血病细胞 Jurkat 黏附、运动和侵袭的影响[J].重庆医科大学学报,2008,33(4):403-406.
- [4]赵永辰,陈信义.川芎嗪临床应用研究[J].中国医药学报,2002,17(1):53-56.
- [5]de Bont ES,Rosati S,Jacobs S,et al. Increased bone marrow vascularization in patients with acute myeloid leukaemia: a possible role for vascular endothelial growth factor [J]. Br J Haematol,2001,113(2):296-304.
- [6]窦慧丽,刘宝山.中医药干预白血病围化疗期临床研究概述[J].中医杂志,2011,52(9):797-799.

(收稿日期:2011-06-14;修回日期:2012-01-08)

[编辑:行之]

(上接第 1128 页)

参考文献

- [1]许保磊,张茁,吴升平.肥胖与卒中[J].中国卒中杂志,2008,3(10):743-745.
- [2]戚迎梅.代谢综合征并中风的临床调研及其病机与证候研究[D].济南:山东中医药大学,2008.
- [3]国家中医药管理局脑病急症协作组.中风病诊断与疗效评定标准(试行)[J].北京中医药大学学报,1996,19(1):55-56.
- [4]郭蓉娟,王建华,解庆凡,等.类中风研究(Ⅲ)—类中风类诊断方案与临床验证[J].北京中医药大学学报,2000,23

(3):55-56.

- [5]国家中医药管理局脑病急症科研组.中风病辨证诊断标准(试行)[J].北京中医药大学学报,1994,17(3):64-66.
- [6]中国肥胖问题工作组.中国成人超重和肥胖症预防与控制指南(节录)[J].营养学报,2004,26(1):1-4.
- [7]International Obesity Taskforce. The Asia-Pacific Perspective: Redefining obesity and its treatment[C]. Milan: Health Communications Australia Pty Limited, International Association for Study of Obesity,2000:8-14.

(收稿日期:2011-09-07;修回日期:2011-11-21)

[编辑:邓媛]