

· 实验研究 ·

鼠尾草酸增加 1,25(OH)₂D₃ 诱导 HL-60 细胞分化及其机制研究

任立红,陈娟娟,安慧萍

(哈尔滨医科大学第二临床学院儿科,黑龙江 哈尔滨 150086)

[摘要] 目的 已证实 1, 25(OH)₂D₃ 可以诱导 HL-60 细胞向成熟单核细胞分化,但其不足之处是高钙血症和形成耐药株。该实验应用鼠尾草酸(CA)联合 1, 25(OH)₂D₃ 研究对 HL-60 细胞分化的影响及引起细胞内活性氧(ROS)水平和细胞内钙离子浓度的改变。**方法** 应用鼠尾草酸,1,25(OH)₂D₃ 单独和联合应用处理 HL-60 细胞,共分为 5 组:空白对照组;低浓度 1,25(OH)₂D₃ (1 nmol/L)组、鼠尾草酸组;联合处理组(10 μmol/L 鼠尾草酸和 1 nmol/L 1,25(OH)₂D₃);高浓度 1,25(OH)₂D₃ (100 nmol/L)组。每 24 h 监测 1 次,通过四唑氮蓝(MTT)法观察细胞生长,共 72 h;收集处理后 72 h 的 HL-60 细胞,通过光学显微镜观察细胞形态,用流式细胞仪(FCM)检测不同处理组细胞周期及单核细胞分化标记 CD14 的表达,ROS 和细胞内钙离子浓度。**结果** 72 h 后,联合处理组 HL-60 细胞与空白对照组相比,细胞增殖明显受抑制($Ab = 0.560 \pm 0.020$; $P < 0.01$),细胞形态具有成熟单核细胞特征,CD14 的表达率升高(57.62% ; $P < 0.01$),G0/G1 期细胞显著增多,ROS 水平下降($52.67 \pm 10.76\%$; $P < 0.01$);联合处理组细胞内钙离子水平同空白对照组比较差异无显著性(115.64 ± 17.74 nmol/L, $P > 0.05$),但与高浓度 1, 25(OH)₂D₃ 组相比细胞内钙离子水平明显下降($P < 0.01$)。**结论** 鼠尾草酸可增强 1,25(OH)₂D₃ 对 HL-60 细胞的诱导分化、增强抑制 HL-60 细胞增殖作用,细胞阻滞于 G0/G1 期,细胞内活性氧水平降低,这可能与细胞的诱导分化机制有关,且这一联合作用不增高细胞内钙离子水平。 [中国当代儿科杂志,2008,10(1):55-59]

[关键词] 1, 25(OH)₂D₃; 鼠尾草酸;细胞分化;活性氧;HL-60 细胞
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)01-0055-05

Enhancement of differentiation induction of HL-60 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in combination with carnosic acid

REN Li-Hong, CHEN Juan-Juan, AN Hui-Ping. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China (Email:renlihong1@hotmail.com)

Abstract: Objective 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ [1, 25(OH)₂D₃] is a potent inducer of differentiation in myeloid leukemia cells, but its clinical use is limited due to its hypercalcaemic effect and resistance. Carnosic acid is a plant-derived polyphenol food preservative with chemoprotective effects against carcinogens. Recent research has shown that carnosic acid potentiates the effects of 1, 25(OH)₂D₃ on differentiation of human leukemia cells. This study examined the effects of 1, 25(OH)₂D₃ in combination with carnosic acid on monocytic differentiation as well as intracellular reactive oxygen species (ROS) and Ca²⁺ levels in human leukemia HL-60 cells. **Methods** HL-60 cells were randomly treated with 1 nmol/L 1, 25(OH)₂D₃, 100 nmol/L 1, 25(OH)₂D₃, 10 μmol/L carnosic acid, a combination of 1 nmol/L 1, 25(OH)₂D₃ and 10 μmol/L carnosic acid or placebo. Cell growth was observed by MTT assay for 72 hrs at an interval of 24 hrs. Cells were harvested after 72 hrs of culture. Morphologic features of the cells were observed by microscopy. Flow cytometry was used to detect cell cycle, monocytic differentiation marker CD14 expression, and intracellular ROS and Ca²⁺ levels. **Results** A combination of 1 nmol/L 1,25(OH)₂D₃ and 10 μmol/L carnosic acid resulted in greater proliferation inhibition ($Ab: 0.560 \pm 0.020$ vs 1.482 ± 0.327 ; $P < 0.01$), mature monocytic features, G0/G1 cell arrest, higher CD14 expression ($57.62 \pm 0.81\%$ vs $2.76 \pm 0.828\%$; $P < 0.01$), lower intracellular ROS levels ($52.67 \pm 10.76\%$ vs $86.46 \pm 40.52\%$; $P < 0.01$) and similar intracellular Ca²⁺ levels in HL-60 cells when compared with the placebo group. The ability of a combination of 1 nmol/L 1,25(OH)₂D₃ and 10 μmol/L carnosic acid to inhibit the proliferation and induce the differentiation of HL-60 cells was similar to that of 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃, while the intracellular Ca²⁺ level (115.64 ± 17.74 nmol/L vs 185.75 ± 27.38 nmol/L) was significantly lower than that in the 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃ group. **Conclusions** Low concentration of 1,25(OH)₂D₃ combined with 10 μmol/L carnosic acid can produce enhanced differentiation, proliferation inhibition and antioxidant effects of HL-60 cells. The combination of the two inducers

[收稿日期]2007-03-24;[修回日期]2007-05-08
[作者简介]任立红,女,主任医师。主攻方向:血液系统疾病。

dose not increases intracellular Ca^{2+} levels.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (1):55-59]

Key words: 1,25-dihydroxyvitamin D_3 ; Carnosic acid; Cell differentiation; Reactive oxygen spesies; HL-60 cell

1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 不仅有维持体内钙离子稳定,还具有诱导细胞分化、抑制细胞增生、调节某些原癌基因表达以及免疫调节等功能,尤其对急性髓性白血病细胞的调节和诱导分化具有重要作用。体内外实验证明 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 可以诱导 HL-60、NB4 等细胞向成熟单核细胞的分化,并抑制细胞的增殖,因此 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 是除维甲酸以外的另一种有前途的肿瘤细胞诱导分化剂。研究发现与其他药物联合应用可减少 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 的剂量,并提高肿瘤细胞对 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 的敏感性^[1]。

近期发现几种从植物提取的抗氧化剂化合物可增强 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 对白血病细胞系的分化和抗增殖作用,如多酚类姜黄和水飞蓟素、类胡萝卜素,番茄红素等。鼠尾草酸(CA)为一种从迷迭香提取的多酚类物质,有研究^[2]已发现其在促进某些试剂诱导白血病细胞分化方面有一定作用。最近已有将 CA 与 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 衍生物联用于粒细胞白血病鼠模型,发现它们在抗肿瘤方面有明显的协同效应,该研究将为 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 临床治疗粒细胞白血病起明显推动作用^[3]。研究表明 100 nmol/L 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 对 HL-60 细胞有明显诱导分化作用,而 10 nmol/L 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 对该细胞系无诱导分化效应^[4],本实验将 CA 与低浓度的 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ (1 nmol/L)联合作用于 HL-60 细胞,观察 HL-60 细胞生长、诱导分化情况,并与 100 nmol/L 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 作比较,研究二者是否有协同作用,并进一步观察细胞内活性氧水平的改变及细胞内钙离子浓度的改变。

1 材料和方法

1.1 材料

- 1.1.1 细胞株 HL-60 细胞购于天津血研所。
- 1.1.2 试剂 鼠尾草酸,1, 25(OH) $_2$ D $_3$,Fluo-3 (含 F127), MTT,均购于 Sigma 公司,EGTA 购于 Solarbio 公司;FITC-CD14 为美国 BD 公司产品。活性氧检测试剂盒购于普利莱基因技术有限公司;RPMI1640,胎牛血清(FBS),PBS 为 Hyclone 产品;无水乙醇,二甲亚砜均由哈尔滨医科大学二院试验中心提供。流式细胞仪 FAC Sort 为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

- 1.2.1 细胞培养 HL-60 悬浮培养于含 10% 胎

- 牛血清的 RPMI 1640 培养基中,于 5% CO $_2$,37℃ 饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3 d 传代 1 次。
- 1.2.2 药物的配置 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 和鼠尾草酸用无水乙醇配成储存液,-20℃ 避光保存。用前以培养基稀释,1,25(OH) $_2$ D $_3$ 的终浓度为 1 nmol/L,100 nmol/L,鼠尾草酸终浓度为 10 μ mol/L。乙醇体积分数低于 0.1%,试验表明该浓度对 HL-60 细胞没有影响。
- 1.2.3 试验分组及用药方法 取对数生长期细胞,按 5×10^5 /mL 起始浓度接种于 6 孔板中培养,共分 5 组。1 组为空白对照组,加等量无水乙醇,终浓度的体积小于 0.1%;2 组为低浓度 1,25(OH) $_2$ D $_3$,加入 1 nmol/L 1,25(OH) $_2$ D $_3$;3 组为联合处理组,加入 10 μ mol/L 鼠尾草酸和 1 nmol/L 1,25(OH) $_2$ D $_3$,4 组为鼠尾草酸组,加入 10 μ mol/L 鼠尾草酸;5 组为高浓度 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 组,加入 100 nmol/L 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 。置于 5% CO $_2$,37℃ 饱和湿度的培养箱中避光培养。每组试验重复 3 次。
- 1.2.4 观察细胞的生长状态 取对数生长期细胞,以 1×10^5 /L 接种于 96 孔板,根据实验要求加入不同药物共 200 μ L,平行 3 个复孔,置于 CO $_2$ 培养箱中培养,每 24 h 检测 1 次。于每次检测前 4 h 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μ L,37℃ 继续孵育 4 h,然后终止培养,离心,弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO,充分溶解结晶物,而后选择 492 nm 波长在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果,共 3 d,同时台盼蓝染色观察细胞活力。
- 1.2.5 细胞形态学检测 将药物处理 72 h 的 HL-60 细胞取 1 mL 细胞悬液离心涂片,自然晾干后用 Wright-Giemsa 染色 10 min,在光学显微镜下观察细胞形态的变化。
- 1.2.6 细胞表面标记 CD14 的检测 离心收集药物处理 72 h 的细胞,调整细胞密度为 5×10^6 /L,取 2 份细胞悬液各 100 μ L,分别加入 10 μ L 的 FITC-CD14,轻微混匀后避光孵育 30 min,再加入 400 μ L 1 $\times$ PBS 溶液,流式细胞仪检测。
- 1.2.7 细胞周期动力学检测 分别离心收集药物作用 72 h 的细胞,以 70% 的乙醇固定,4℃ 保存。测定前将标本用 1 $\times$ PBS 洗涤 3 次,RNA 酶 (1 g/L) 消化 15 min (37℃),碘化丙锭 (PI, 50 mg/L) DNA 染色 30 min,然后用流式细胞仪检测细胞周期。
- 1.2.8 细胞内活性氧水平测定 测定方法参照

文献^[5]进行,2',7'-二氯荧光乙酰乙酸盐(2',7'-dichloro fluorescein diacetate, DCFH-DA)自由扩散进入细胞后被酯酶催化变成 DCFH,在活性氧存在下被氧化成 2',7'-二氯荧光素(DCF),DCF 荧光强度与细胞内活性氧水平显示正相关性。DCF 的激发波长为 450 nm,吸收波长为 530 nm。收集孵育 72 h 不同组别的细胞,调整细胞数为 1×10^6 ,用 PBS 洗 2 次,将 10 mmol/LDCFH-DA 用 PBS 按 1:1 000 稀释为 10 μ mol/L,加入细胞重新悬浮,在 37℃避光孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次,收集细胞,流式细胞仪分析。

1.2.9 细胞内 Ca^{2+} 浓度测定 Fluo-3AM 是一种可透膜的 Ca^{2+} 荧光探针,激发波长 506 nm,吸收波长 526 nm,进入细胞后与 Ca^{2+} 结合,其荧光强度与 Ca^{2+} 含量呈正比。收集孵育 72 h 不同组别的细胞,调整细胞数为 1×10^6 ,用 PBS 洗去培养液,PBS 1 mL 悬浮细胞,加入含 F-127 的 Fluo-3AM DMSO 溶液,使其终浓度 5 mmol/L,37℃避光孵育 1 h。用 PBS 洗涤 3 次,悬浮细胞,用流式细胞仪测得荧光值为 F;然后加入 TritonX-100(终浓度为 0.1%)和 CaCl_2 (终浓度为 5 mmol),室温避光孵育 5 min,用流式细胞仪获取测得的荧光值为最大值 F_{max} ,然后再加入 EGTA(终浓度为 10mmol/L,pH=8.0),室温避光孵育 5 min 测得的荧光值为最小值 F_{min} 。用公式计算细胞内钙离子浓度, $[\text{Ca}]_{\text{i}} = \text{kd} \times [\text{F}-\text{F}_{\text{min}}]/[\text{F}_{\text{max}}-\text{F}]$, $\text{kd} = 450 \text{ nm}$ 。

1.3 统计学处理

计量数据用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有试验结果均重复 3 次,SPSS13.0 软件处理,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组不同时间对 HL-60 细胞生长的影响

低浓度 1,25(OH)₂D₃ 对 HL-60 细胞无明显生长抑制作用,与对照组比较无统计学差异($P>0.05$);联合处理组的生长抑制作用明显高于空白对照组($P<0.01$),作用效应约增加 100 倍,与高浓度 1,25(OH)₂D₃ 组比较无差异($P>0.05$),同

时台盼蓝染色表明各组较少出现死细胞。说明 1,25(OH)₂D₃ 与 CA 联用对 HL-60 细胞增殖有显著的抑制作用(表 1)。

2.2 形态学改变

HL-60 细胞经高浓度 1,25(OH)₂D₃ 作用 72 h 后细胞形态向单核细胞分化:细胞形态不规则,核浆比变小,细胞核由圆形变为肾型、马蹄形等,可有折叠,染色质疏松,细胞质可见颗粒。联合处理组细胞形态与高浓度 1,25(OH)₂D₃ 组细胞形态相似,细胞也向单核细胞分化。

2.3 细胞表面标记 CD14 表达的检测

CD14 是成熟单核细胞的表面抗原之一,随着细胞的分化其表达逐渐升高,检测 CD14 的表达情况可反映细胞向单核细胞分化的程度。实验结果表明,联合处理组作用 72 h 后,57.62% 的细胞 CD14 表达阳性,与对照组、低浓度 1,25(OH)₂D₃ 组比较阳性率明显升高($P<0.01$),与高浓度 1,25(OH)₂D₃ 相比无明显差异($P>0.05$),而 10 μ mol/L 鼠尾草酸组的 CD14 的表达与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。说明 CA 可使 1,25(OH)₂D₃ 的诱导分化作用增强(表 2)。

2.4 细胞周期的检测

联合处理组、高浓度 1,25(OH)₂D₃ 作用 72 h 后,两组 G0/G1 期细胞较对照组显著增高($P<0.01$),各组 S 期显著下降($P<0.01$),说明细胞增殖抑制于 G0/G1 期(表 3)。

2.5 细胞内活性氧水平变化

表 4 显示单独应用鼠尾草酸和低浓度 1,25(OH)₂D₃ 处理细胞,ROS 与对照组无明显差异($P>0.05$),而联合处理组显示 ROS 水平明显下降($P<0.01$),与高浓度 1,25(OH)₂D₃ 相比 ROS 水平无明显差异($P>0.05$)。

2.6 细胞内 Ca^{2+} 水平变化

表 5 显示高浓度 1,25(OH)₂D₃(100 nmol/L)使细胞内钙离子明显高于空白对照组($P<0.01$),而应用联合处理组,细胞内钙离子与空白对照组无明显差异($P>0.05$),较高浓度 1,25(OH)₂D₃ 细胞内钙水平明显降低($P<0.01$)。

表 1 1,25(OH)₂D₃和 CA 对 HL-60 细胞生长的影响 Ab, ($\bar{x} \pm s$)

组 别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.310 ± 0.068	0.642 ± 0.008	1.482 ± 0.327
低浓度 1,25(OH) ₂ D ₃ 组	0.272 ± 0.034	0.552 ± 0.032 ^b	1.259 ± 0.041 ^b
联合处理组	0.237 ± 0.014	0.437 ± 0.012 ^a	0.560 ± 0.020 ^a
鼠尾草酸组	0.264 ± 0.036	0.503 ± 0.023	0.752 ± 0.035 ^a
高浓度 1,25(OH) ₂ D ₃ 组	0.239 ± 0.023	0.266 ± 0.027 ^{a,b}	0.553 ± 0.044 ^a

注:a:与空白对照组比较 $P<0.01$; b:与联合组比较 $P<0.01$ 。

表 2 1,25(OH)₂D₃ 和 CA 对 HL-60 细胞作用 72 h 后 CD14 表达的影响 (x̄ ± s)

组 别	CD14 阳性 (%)
空白对照组	2.76 ± 0.828 ^b
低浓度 1,25(OH) ₂ D ₃ 组	14.28 ± 3.192 ^{a,b}
联合处理组	57.62 ± 0.817 ^a
鼠尾草酸组	4.26 ± 0.549 ^b
高浓度 1,25(OH) ₂ D ₃ 组	60.99 ± 1.496 ^a

注:a:与空白对照组比较 $P < 0.01$; b:与联合组比较 $P < 0.01$ 。

表 3 1,25(OH)₂D₃ 和 CA 对 HL-60 细胞周期的影响 (x̄ ± s)

组 别	G0 /G1 期	S 期
空白对照组	37.015 ± 0.615 ^b	62.96 ± 1.566 ^b
低浓度 1,25(OH) ₂ D ₃ 组	45.535 ± 2.609 ^{a,b}	51.67 ± 2.85 ^a
联合处理组	56.715 ± 1.28 ^a	41.55 ± 1.364 ^a
鼠尾草酸组	42.765 ± 1.775 ^b	51.64 ± 1.167 ^a
高浓度 1,25(OH) ₂ D ₃ 组	52.185 ± 1.322 ^a	43.22 ± 1.287 ^a

注:a:与空白对照组比较 $P < 0.01$; b:与联合组比较 $P < 0.01$ 。

表 4 流式细胞仪显示不同处理组细胞内 ROS 水平 (x̄ ± s)

组 别	ROS 水平 (%)
空白对照组	86.46 ± 4.52
低浓度 1,25(OH) ₂ D ₃ 组	81.42 ± 4.70
联合处理组	52.67 ± 10.76
鼠尾草酸组	89.69 ± 5.51
高浓度 1,25(OH) ₂ D ₃ 组	51.08 ± 10.01

注:a:与对照组相比 $P < 0.01$ 。

表 5 流式细胞仪显示不同处理组细胞内钙离子水平 (x̄ ± s)

组 别	[Ca] ²⁺ (nmol/L)
空白对照组	100.58 ± 14.82
低浓度 1,25(OH) ₂ D ₃ 组	95.42 ± 8.83 ^b
联合处理组	115.64 ± 17.74 ^b
鼠尾草酸组	124.41 ± 9.8 ^b
高浓度 1,25(OH) ₂ D ₃ 组	185.75 ± 27.38 ^a

注:a:与空白对照组相比 $P < 0.01$; b:与高浓度 1,25(OH)₂D₃ 相比 $P < 0.01$ 。

3 讨论

维生素 D 是一种脂溶性维生素,它与甲状旁腺激素、降钙素一样,可看作是调节体内钙代谢的激素。它的作用除维持机体离子稳定和促进骨骼重吸收外,还具有诱导细胞分化、抑制细胞增殖、拮抗胶原形成、调节原癌基因表达以及免疫调节等功能。体外实验证实,1,25(OH)₂D₃ 除了对骨肉瘤细胞系、乳腺癌细胞、膀胱癌、前列腺癌、肺癌和结肠癌等

恶性细胞有生长抑制效应^[6],还能诱导多种白血病细胞株(HL-60、NB4 等)向单核巨噬细胞分化,并对白血病细胞的增殖起抑制作用^[7]。临床应用 1,25(OH)₂D₃ 治疗多种血液病如急性早幼粒细胞白血病、骨髓纤维化、骨髓增生异常综合征等取得一定疗效。1,25(OH)₂D₃ 作为一种有效的肿瘤诱导分化剂已越来越受到重视。

随着 1,25(OH)₂D₃ 的广泛应用,其不足之处也逐渐显露了出来,主要是导致高钙血症^[5]。另一方面,耐药株的出现也影响了疗效。为克服这些问题,一方面致力于 1,25(OH)₂D₃ 衍生物的研究,以期获得高效低毒的药物;另一方面将 1,25(OH)₂D₃ 与其他药物如诱导分化剂、抗肿瘤药、细胞因子、中药等联合应用,以提高肿瘤细胞对 1,25(OH)₂D₃ 的敏感性,从而降低用量。实验结果显示,10 μmol/L 的 CA 与 1 nmol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 联合应用明显抑制细胞增殖,细胞形态向单核细胞分化,CD14 的表达显著增加,达 57.62%,细胞阻滞于 G0/G1 期,较对照组及单独应用 CA 及低浓度 1,25(OH)₂D₃ 组有显著差异($P < 0.01$),而与高浓度 1,25(OH)₂D₃ 组比较无统计学差异($P > 0.05$),表明 CA 可明显增强 1,25(OH)₂D₃ 诱导的 HL-60 细胞向单核细胞分化,增强约 100 倍。

正如许多致癌剂必须经过体内代谢或体外活化才能攻击 DNA 分子导致肿瘤发生一样,许多化疗药物也是通过自由基途径才实现其抗肿瘤作用的,因为肿瘤细胞内的自由基产生与清除处于失衡状态,产生自由基能力强,而清除自由基能力弱。全反式维甲酸可诱导人 U937、HL-60 细胞的分化时超氧阴离子自由 O₂⁻ 的含量升高几倍到数百倍。五倍子酸在诱导 HL-60 细胞凋亡时作用 5 min 就出现了 ROS 增加且呈浓度依赖性,而抗氧化剂可抑制这种作用^[8]。许多试验证明:结构不同的抗氧化剂,例如多酚,胡萝卜素,维生素 E,维生素 C,类脂类化合物酸都可以增强 1,25(OH)₂D₃ 和 ATRA 诱导白血病细胞分化的作用,但是它们本身并没有诱导分化的作用,它们唯一共同的特点是改变了细胞内的氧化还原状态^[9]。鼠尾草酸属于茶多酚,作为一种食品添加剂,它能有效的清除可以损害生物膜的过氧化氢,次氯酸等,具有很强的抗氧化活性,在细菌中可呈抗诱变作用,并在几种实体瘤细胞和动物模型中有抗癌活性^[10]同时,10 μmol/L ~ 30 μmol/L 的鼠尾草酸可以抑制线粒体、微粒体的脂质过氧化反应^[11],保护红细胞抵御氧化导致的溶血反应,还可

以抑制由人主动脉上皮细胞产生的低密度脂蛋白的氧化作用^[12]。在本试验中,分别用鼠尾草酸和1,25(OH)₂D₃单独和联合应用处理HL-60细胞,观察细胞内ROS水平,随着1,25(OH)₂D₃浓度的升高,ROS水平明显下降,单独应用鼠尾草酸(10 μmol/L)并不显著降低细胞内ROS水平,但是当它和低浓度的1,25(OH)₂D₃联合应用时降低细胞内ROS水平与高浓度1,25(OH)₂D₃降低细胞内ROS水平相似,这表明鼠尾草酸在该试验中是诱导增效剂,它是通过增强1,25(OH)₂D₃的抗氧化作用而改变细胞内的氧化还原状态。1,25(OH)₂D₃诱导白血病细胞分化的机制目前研究最多的是AP-1的作用,AP-1是一种氧化还原敏感的转录调控因子,它可修饰谷胱甘肽从而调节蛋白功能改变^[13],它与位于VDR基因启动子区的DNA反应元件的联结,从而激活或诱导细胞分裂素活化蛋白激酶途径等^[14]。我们推测鼠尾草酸和1,25(OH)₂D₃联合可以增加1,25(OH)₂D₃上调AP-1的功能。

1,25(OH)₂D₃起诱导分化的作用所需浓度为正常生理浓度的103~104倍,易引起高钙血症,因而限制了它的应用^[7]。在本试验中,可以看到高浓度1,25(OH)₂D₃处理组细胞内钙离子明显高于空白对照组和联合处理组($P<0.01$),而空白对照组和联合处理组细胞内钙离子浓度无明显差异($P>0.05$)。这表明鼠尾草酸和1,25(OH)₂D₃联合应用既可以表现出和高剂量1,25(OH)₂D₃相似的分化程度还可以减少由于高钙血症导致的副作用。

[参 考 文 献]

[1] Makishima M, Okabe-Kado J, Honma Y. Growth inhibition and differentiation induction in human monoblastives leukaemia cells by 1 alpha-hydroxyvitamin D derivatives and their enhancement by combination with hydroxyurea[J]. Br J Cancer, 1998, 77(1): 33-39.

[2] Danilenko M, Wang X, Studzinski GP. Carnosic acid and promotion of monocytic differentiation of HL60-G cells initiated by other agents[J]. Nat Cancer Ins, 2001, 93(16):1224-1233.

[3] Sharabani H, Izumchenko E, Wang Q, Kreinin R, Steiner M, Barvish Z, et al. Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia[J]. Int J Cancer, 2006, 118(12):3012-3021.

[4] 任立红,曲辉,李钰,冯玉芝,刘晓阳. 1,25-二羟基维生素 D3 和维生素 K2 联合诱导 HL-60 细胞分化及凋亡的研究[J]. 临床血液学杂志,2005,18(3):171-174.

[5] Shen HM, Shi CY, Shen Y, Ong CN. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1[J]. Free Radic Biol Med, 1996, 21(2):139-146.

[6] Van den Bemd GJ, Chang GT. Vitamin D and vitamin D analogs in cancer treatment[J]. Curr Drug Targets, 2002, 3(1):85-94.

[7] Studzinski GP, McLane JA, Uskokovic MR. Signaling pathways for vitamin D-induced differentiation: implications for therapy of proliferative and neoplastic diseases[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1993, 3(4):279-312.

[8] Inoue M, Sakaguchi N, Isuzugawa Y, Tani H, Ogihara Y. Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(10):1153-1157.

[9] Sokolosi JA, Shyam K, Sartorelli AC. Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by curcumin in combination with low levels of vitamin D3[J]. Oncol Res, 1997, 9(1):31-39.

[10] Bertl E, Becker H, Eicher T, Herhaus C, Kapadia G, Bartsch H, et al. Inhibition of endothelial cell functions by novel potential cancer chemopreventive agents[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 325(1):287-295.

[11] Aruoma OI, Halliwell B, Aeschbach R, Loligers J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid[J]. Xenobiotica, 1992, 22(2):257-268.

[12] Pearson DA, Frankel EN, Aeschbach R, German JB. Inhibition of endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(3):578-582.

[13] Dandrea T, Bajak E, Warngard L, Cotgreave IA. Protein S-glutathionylation correlates to selective stress gene expression and cyto-protection[J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 406(2):241-252.

[14] Wang Q, Salman H, Danilenko M, Staudiziki GP. Cooperation between antioxidants and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ in induction of leukemia HL-60 cell differentiation through the JNK/AP-1/Egr-1 pathway[J]. J Cell Physiol, 2005, 204(3):964-974.

(本文编辑:吉耕中)