

·实验研究报告·

去铁胺联合阿糖胞苷诱导 HL-60
细胞凋亡作用的实验研究

贾国存¹,刘玉峰²,汤有才³,李丰益¹,房定珠¹,廖清奎¹

(四川大学华西第二医院小儿血液肿瘤研究室,四川 成都 610041; 2. 郑州大学第一附属医院儿科,河南 郑州;
3. 郑州大学第三附属医院儿科,河南 郑州 450000)

[摘 要] 目的 探讨铁螯合剂联合阿糖胞苷诱导 HL-60 细胞凋亡的作用。方法 实验分为 5 组:空白对照组、去铁胺组、阿糖胞苷组、去铁胺 + 阿糖胞苷组、去铁胺 + 阿糖胞苷 + 三氯化铁组。上述各组与 HL-60 细胞共同培养 6,12,24,48 h。通过测定细胞活力、形态学变化、流式细胞仪检测和 DNA 凝胶电泳等观察细胞凋亡等方法观察诱导 HL-60 细胞的作用。结果 去铁胺 + 阿糖胞苷可协同降低 HL-60 细胞活力、抑制 HL-60 细胞增殖、诱导 HL-60 细胞凋亡,其作用随培养时间延长及药物浓度增加而增强。结论 铁螯合剂协同阿糖胞苷具有增强诱导 HL-60 细胞凋亡的作用。

[关 键 词] 去铁胺;阿糖胞苷;细胞凋亡

[中图分类号] R-331 [文献标识码] B [文章编号] 1008-8830(2003)04-0368-03

铁不仅是一种营养元素,而且也是细胞许多重要功能如电子传递、DNA 合成所必需的物质。已有研究发现^[1,2],铁缺乏可诱导肿瘤细胞凋亡,并有望成为肿瘤的治疗方法之一。新近我们在观察铁螯合剂诱导 HL-60 细胞凋亡的基础上,又探讨了铁螯合剂—去铁胺(DFO)联合阿糖胞苷诱导 HL-60 细胞凋亡的作用,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

HL-60 细胞(华西医科大学细胞分子生物学实验室);去铁胺(Giba 公司);阿糖胞苷(Ara-C 上海华联制药有限公司);三氯化铁(Baker 公司);RPMI1640(Gibco 公司);精制小牛血清(Hyclon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组 去铁胺组;阿糖胞苷组;去铁胺 + 阿糖胞苷组;去铁胺 + 三氯化铁 + 阿糖胞苷组;空白对照组(加生理盐水)。

1.2.2 细胞培养 HL-60 细胞置于体积分数为 10%灭活小牛血清的 RPMI1640 培养基中,37℃、5%CO₂ 孵箱中悬浮培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.3 实验检测 分别取培养 6,12,24,48 h 的 HL-60 细胞检测细胞活力、光镜观测细胞凋亡形态并计算凋亡率、DNA 琼脂糖凝胶电泳、流式细胞仪检测凋亡率及细胞周期分布。

1.2.4 统计学处理 采用 SPSS 统计软件处理,实验数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,显著性检验用 *t* 检验。

2 结果

2.1 不同药物组对 HL-60 细胞活力的影响

结果显示,随培养时间的延长及药物浓度的增加,细胞活力逐渐下降,呈时间及剂量依赖性(见图 1)。

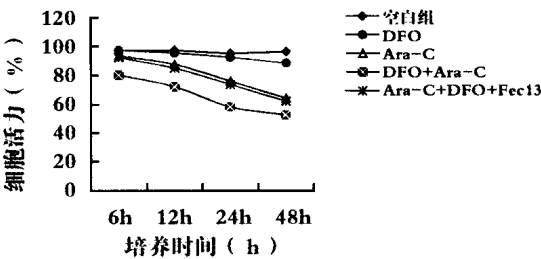


图 1 不同药物组对 HL-60 细胞活力的影响

[收稿日期] 2002-09-30; [修回日期] 2003-01-30
[基金项目] 河南省科委自然科学基金资助项目(984021500)
[作者简介] 贾国存(1962-),男,博士研究生,主治医师。主攻方向:小儿血液肿瘤。

2.2 去铁胺与阿糖胞苷诱导 HL-60 细胞凋亡的作用

用浓度分别为 10 μmol/L、50 μmol/L 的 DFO 加 Ara-C(10 μg/ml) 与 HL-60 共同培养,结果发现 HL-60 细胞凋亡率比单用阿糖胞苷高,与单用阿糖胞苷组相比差异有显著性 (P < 0.05),且有时间及

剂量依赖性(50 μmol/L DFO + Ara-C 10 μg/ml 资料未显示)。48 h 时坏死细胞较多,凋亡率不易计算。在联用等摩尔浓度的三氯化铁后,凋亡率与单用阿糖胞苷相比差异无显著 (P > 0.05),显示 DFO 与阿糖胞苷有协同诱导 HL-60 细胞凋亡的作用,且这种作用可被等摩尔浓度的三氯化铁抵消。见表 1。

表 1 不同药物组对 HL-60 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 8)

药物组	凋亡率 (%)		
	培养 6 h	12 h	24 h
对照组	1.80 ±0.75	4.57 ±0.83	5.23 ±1.45
DFO	3.56 ±0.90	6.67 ±1.49	19.96 ±2.11
Ara-C	8.62 ±2.72	26.30 ±4.26	30.70 ±5.26
Ara-C + DFO	17.95 ±5.67 ^a	38.28 ±4.99 ^a	43.52 ±8.36 ^a
Ara-C + DFO + FeCl ₃	8.73 ±1.56 ^b	28.76 ±5.15 ^b	32.62 ±4.78 ^b

注: Ara-C:10 μg/ml ; DFO、FeCl₃:10 μmol/L
a 与 Ara-C 比 P < 0.01; b 与 Ara-C 比 P > 0.05

2.3 流式细胞仪检测

HL-60 细胞凋亡主要发生于 S + G₁ 期,凋亡率

与形态学计算结果基本一致(见图 2)。

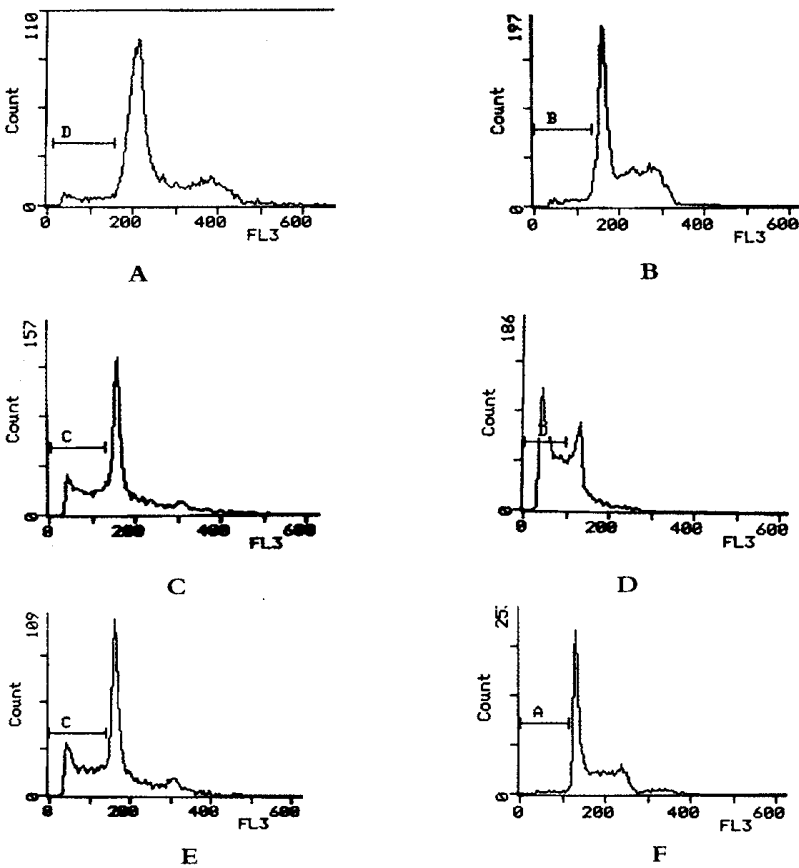


图 2 FCM 检测 HL-60 细胞 24 h 凋亡结果 (凋亡率 %)

A:对照组(6.8 %);B:10 μmol/L 去铁胺(13.6 %);C:10 μg/ml 阿糖胞苷(34.6 %);D:10 μmol/L 去铁胺 + 10 μg/ml 阿糖胞苷(43.5 %);E: 10 μmol/L 去铁胺 + 10 μmol/L 三氯化铁 + 10 μg/ml 阿糖胞苷(33.9 %);F:10 μmol/L 三氯化铁 + 10 μmol/L 去铁胺(7.8 %)

2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳

DNA 琼脂糖凝胶电泳结果显示 DFO + Ara-C 作用于 HL-60 细胞 6 h,即有 DNA 梯带出现。48 h 时呈弥散图像。见表 2。

表 2 DFO + Ara-C 作用于 HL-60 细胞 DNA 电泳结果

药物	作用时间(h)			
	6	12	24	48
DFO	-	-	±	+
DFO + Ara-C	+	++	S	S
Ara-C	±	++	S	S

注:DFO 10 μmol/L,Ara-C 10 μg/ml。- :无梯带;±,+,++ :表示梯带程度;S:表示弥散

3 讨论

白血病是儿童发病率最高的恶性肿瘤性疾病,亦是 5 岁以上儿童主要死亡原因之一^[3],化疗是其主要的治疗方法。近年来,由于化疗方案不断优化,干细胞移植治疗白血病的成功应用及全身支持治疗的加强,使小儿白血病的预后有了极大改善。但仍有部分患儿尤其是急性髓性白血病患者不能达到完全缓解或缓解后复发,因而探讨诱导白血病细胞凋亡和影响白血病细胞凋亡的相关因素及其机制,对优化白血病治疗的具体措施,提高白血病患者长期无病生存率具有重要意义。

我们已有的研究表明铁螯合剂可诱导肿瘤细胞调亡^[4]。Sarti^[5]等研究发现 Ara-C 可降低 AML 细胞内非血红蛋白结合铁且随转铁蛋白受体表达的上调细胞内铁恢复。表明转铁蛋白受体的上调是为适

应 Ara-C 干扰细胞铁代谢影响细胞生长的需求。铁剥夺可抑制肿瘤细胞生长,诱导其凋亡;化疗药物通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用^[6]。基于这些发现,我们观察是否这两种药物共同作用于 HL-60 细胞可导致一相加效应。本研究显示较低浓度的 DFO 与较低浓度的 Ara-C,比单用 Ara-C 凋亡率高,表明整合铁剂与化疗药物诱导 HL-60 细胞凋亡有协同作用。

联用铁螯合剂治疗肿瘤已开始试用于临床。我们的研究结果初步提示联用铁螯合剂与化疗药物作为白血病的治疗方法,可能减少化疗药物的用量,减轻其毒副作用。

[参 考 文 献]

[1] Riaz U-Haq, Wereley JP, Chitambar CR. Induction of apoptosis by iron deprivation in human leukemic CCRF-CEM cells [J]. Exp Hemetol, 1995, 23(5): 428 - 432.

[2] Kicic A, Chua AC. G, Baker E. Effect of iron chelators on proliferation and iron uptake in hepatoma cells [J]. Cancer, 2001, 92(12): 3093 - 3110.

[3] Hamre MR, Williams J, Chuba P, et al. Early deaths in childhood cancer [J]. Med Pediatr Oncol, 2000, 34(5): 343 - 347.

[4] 刘玉峰,曾利,伍学强,等. 去铁胺诱导 HL-60 细胞凋亡及对 C-myc 基因表达的影响 [J]. 实用儿科临床杂志,2001, 16(6): 395 - 396.

[5] Sarti P, Gnobbli PD, Agostino I, et al. Liposomal targeting of leukemia HL-60 cells induced by transferring-receptor endocytosis [J]. Biotechn Appl Biochem, 1996, 24(Pt3): 269 - 276.

[6] Liu T, Raetz E, Moos PJ, et al. Diversity of the apoptotic response to chemotherapy in childhood leukemia [J]. Leukemia, 2002, 16(2): 223 - 232.

(本文编辑:吉耕中)

(上接第 367 页)

促进血小板的凝集血块收缩,阻止出血部位血凝块的液化,促进溃疡和胃粘膜糜烂等病变的愈合^[2]。因此,善得定用于治疗上消化道大出血具有其它止血剂、胃粘膜保护剂、抑酸剂无法比拟的优点,因而止血效果显著。但用于新生儿目前国内未见报道,不少学者担心善得定除上述止血机制外,尚可抑制生长激素(GH)和促甲状腺激素(TSH)的分泌^[3],对患儿的生长发育不利,还可抑制胰岛素的分泌造成高血糖,但本文 6 例患儿应用善得定后,当时未发现恶心、腹胀、呕吐、腹泻等副作用,监测血糖均正常。且随访 1.5~3 年,其身高、体重、骨龄、智力发育、甲状腺功能均在正常范围。说明善得定用

于治疗新生儿上消化道大出血安全有效,由于其价格昂贵,不宜作为常规用药,但在常规治疗无效的情况下应及时应用,以抢救患儿生命。

[参 考 文 献]

[1] 姚育红,石巍. 善得定治疗难治性上消化道大出血 67 例 [J]. 衡阳医学院学报,2000, 28(1): 65 - 69.

[2] 严华,诸志祚,汪敏,等. 善得定治疗急性重症上消化道大出血 6 例 [J]. 中国急救医学,1994, 14(2): 32 - 33.

[3] 李烨焮. 新生儿胃肠道生长抑素的探讨[综述] [J]. 国外医学儿科学分册,1995, 22(1): 24 - 27.

(本文编辑:吉耕中)