

文章编号:1000-582X(2004)11-0145-03

小剂量阿糖胞苷体外诱导 HL-60 细胞凋亡的作用*

杜冰¹,朱道银²,唐恩洁¹

(1. 川北医学院 分子生物学研究所, 四川南充 637007; 2. 重庆医科大学 微生物学教研室, 重庆 400016)

摘要:阿糖胞苷是白血病的重要药物,其小剂量化疗仍用于临床治疗白血病,并取得了一定的疗效,但其作用机制尚未完全阐明,可能与药物诱导细胞分化或凋亡有关。文中用 TUNEL 法和流式细胞仪分析小剂量 Ara-C(10^{-8} M)对 HL-60 细胞周期和细胞凋亡的影响,用免疫组化法和原位杂交法分别检测 P53 蛋白和 p53mRNA、bcl-2mRNA 表达水平的改变,以探讨 bcl-2 和 p53 基因表达与小剂量阿糖胞苷诱导 HL-60 细胞凋亡的关系。结果表明:小剂量 Ara-C 能诱导 HL-60 细胞凋亡,其分子机制可能与 P53 蛋白、p53mRNA 表达增加和 bcl-2mRNA 表达降低有关。

关键词:阿糖胞苷;凋亡;HL-60 细胞;bcl-2;p53

中图分类号:Q786

文献标识码:A

化疗是治疗白血病的重要方法。过去人们一直强调足量、联合化疗,以加强药物的细胞毒作用。目前,在强调个体化治疗的原则下,单一药物的小剂量化疗仍用于临床治疗白血病,并取得了一定的疗效,但其作用机制尚未完全阐明,可能与药物诱导细胞分化或凋亡有关^[1]。有研究认为,体外化疗药物是否能够有效地诱导白血病细胞凋亡是判断急性髓系白血病(AML)患者化疗敏感性的重要指标^[2]。药物诱导正常细胞或癌细胞凋亡,其细胞凋亡的敏感性取决于凋亡诱导基因与凋亡抑制基因间的功能平衡^[1]。阿糖胞苷是治疗白血病的重要药物,为了解小剂量阿糖胞苷治疗白血病的分子机制,研究以 HL-60 白血病细胞株为靶细胞,采用 TUNEL 法和流式细胞分析技术、免疫组化技术、原位杂交技术等方法,观察小剂量阿糖胞苷体外诱导 HL-60 细胞凋亡及对细胞周期的影响,HL-60 细胞 P53 蛋白和 p53 mRNA 和 bcl-2 mRNA 表达的变化,为深入探讨小剂量 Ara-c 治疗白血病的分子机制提供依据。

1 实验方法

1.1 细胞培养法

人白血病细胞株 HL-60(重庆医科大学肝病研

究所馈赠)由川北医学院分子生物学实验室常规传代培养。

1.2 TUNEL 法检测细胞凋亡

于药物作用后的第 3 天分别收集 Ara-C(10^{-8} M)处理组和未处理组 HL-60 细胞,离心涂片。利用德国 Roche Molecular Biochemicals 生产的原位细胞死亡检测试剂盒,并按其说明书中介绍的步骤进行染色处理,DAB 显色后普通显微镜下观察。

1.3 细胞周期动力学和细胞凋亡率的检测

实验分 Ara-C(10^{-8} M)处理组和未处理组。药物处理后的 HL-60 细胞悬液于 37℃,5% CO₂ 条件下培养 3 d,分别收集各组细胞并计数。经 FACS 常规预处理细胞后,流式细胞仪测定细胞周期分布及凋亡率。

1.4 P53 蛋白表达水平检测

于药物作用后的第 2、4、6 天分别收集 Ara-C(10^{-8} M)处理组和未处理组 HL-60 细胞,离心涂片。采用免疫组化法观察 Ara-C 作用前后 P53 蛋白表达的变化。高倍镜下随机计数 200 个细胞,计算阳性细胞的百分率。实验重复 3 次。

1.5 P53 mRNA 和 bcl-2mRNA 表达的检测

采用原位杂交技术检测 P53 mRNA 和 bcl-2mRNA 的表达,参照蔡文琴等^[3]方法进行。于药物作用后的

* 收稿日期:2004-06-12

基金项目:四川省教育厅重点项目(01LA65)

作者简介:杜冰(1968-),女,四川南充人,川北医学院硕士,主要从事分子生物研究。

第2、4、6天分别收集 Ara-C (10^{-8} M) 处理组和未处理组 HL-60 细胞,离心涂片。4% 多聚甲醛固定 30 min,用 Dig-P₅₃-SN₃cDNA 探针和 Dig-bcl-2cDNA 探针进行原位杂交,以不含探针的杂交液进行杂交孵育作为阴性对照。油镜下随机计数 200 个细胞,计算阳性细胞的百分率,实验重复 3 次。

1.6 统计学处理方法

细胞周期分布及细胞凋亡结果显示阳性百分率(%),并做 χ^2 检验。其余数据显示 $\bar{x} \pm s$,采用 t 检验进行统计分析。

2 实验结果

1) TUNEL 法检测细胞凋亡结果。对照组细胞涂片上 TUNEL 反应阳性细胞率为 $(6.78 \pm 1.53)\%$ 。Ara-C (10^{-8} M) 处理组可见较多呈黄赫色或黑赫色的 TUNEL 阳性细胞核 $(25.14 \pm 2.65)\%$,表明其凋亡细胞数显著多于对照组 ($P < 0.01$)。

2) 流式细胞仪对细胞周期及细胞凋亡的分析结果。Ara-c 作用后,HL-60 细胞 G₀/G₁ 期比例增高,凋亡率亦增高(见表 1)。

表 1 流式细胞仪对细胞周期及细胞凋亡的分析结果

Group	t/d	细胞周期和细胞凋亡率/%			
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	凋亡率
Control	3	26.06	59.34	14.61	10.2
Ara - C	3	58.73 ^c	39.22	2.05	29.04 ^c

说明:与对照组比较,^cP < 0.01

3) Ara-C 对 HL-60 细胞 p53mRNA、P53 蛋白及 bcl-2mRNA 表达的影响。Ara-C 对 HL-60 细胞 p53mRNA、P53 蛋白诱导表达的作用随着作用时间的延长同步增强 ($r = 0.9973$); bcl-2mRNA 表达同步下降(见图 1)。

3 讨论

细胞凋亡 (apoptosis) 不同于坏死 (necrosis),前者是细胞主动参与的自杀性程序性死亡,后者是外界损伤因素直接破坏细胞的生物膜和能量代谢,导致细胞生命活动的终止。周剑锋^[4]等研究发现,诱导细胞凋亡是化疗药物杀灭白血病细胞的主要机制之一。

无论是正常细胞还是癌细胞,其对化疗药物诱导细胞凋亡的敏感性取决于凋亡诱导基因与凋亡抑制基因间的功能平衡。有资料表明,野生型 p53 是肿瘤细胞凋亡诱导基因,当细胞 DNA 受损不能修复时,P53 可通过其转录因子活性,激活 fas、bax 等凋亡调控基因

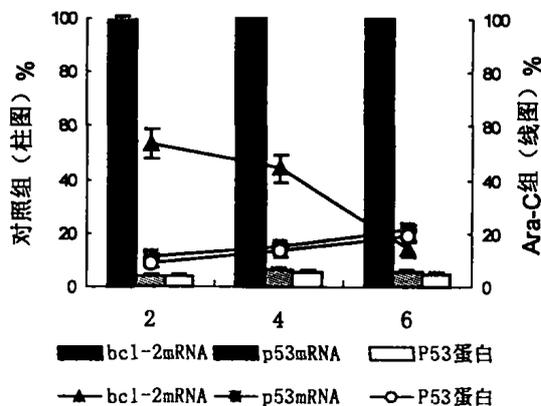


图 1 小剂量阿糖胞苷对 HL-60 细胞 p53mRNA、P53 蛋白和 bcl-2mRNA 表达的时效关系。

注:第 2、4、6 天的 p53mRNA、P53 蛋白和 bcl-2mRNA 表达与相应对照组比较, $P < 0.01$ 。对照组 3 种物质的表达随时间延长无明显变化 ($P > 0.05$)

或致水解蛋白酶活化,以及迄今尚不清楚的其它途径,诱导细胞凋亡^[5-6]。另一方面,bcl-2 是一个抑制细胞凋亡的癌基因,在生理状态下的细胞很少表达,但在异常细胞(如淋巴瘤、多发性骨髓瘤和急性髓细胞性白血病)中,bcl-2 表达明显增高,且其表达与细胞恶性程度成正相关^[7]。资料显示,bcl-2 的过度表达能抑制细胞凋亡。

本研究用 TUNEL 法和流式细胞仪技术均观察到小剂量阿糖胞苷能诱导 HL-60 细胞凋亡,同时可见 p53mRNA 和 P53 蛋白的表达随作用时间延长而同步显著增加,提示小剂量阿糖胞苷诱导细胞凋亡的分子机制可能与 P53 介导的细胞凋亡有关;而 bcl-2 的表达明显减少,提示抑制细胞凋亡的 bcl-2 基因表达亦与小剂量 Ara-C 诱导 HL-60 细胞凋亡有关。

参考文献:

- [1] LOTEM J, SACHS L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes [J]. *Leukemia*, 1996, 10(6): 925 - 931.
- [2] 许小平, 史剑慧, 费新红, 等. 体外化疗药物诱导白血病细胞凋亡预测临床疗效 [J]. *肿瘤学杂志*, 2003, 9(3): 82 - 84.
- [3] 蔡文琴, 王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994.
- [4] 周剑锋, 陈燕, 李崇渔, 等. 阿糖胞苷诱导 HL-60 细胞凋亡的研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1997, 19(2): 107 - 110.
- [5] LI Y, JENKINS C W, NICHOLS M A, et al. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin - dependent kinase inhibitor p21 [J]. *Oncogene*, 1994, 9(8): 2 261 - 2 268.

- [6] OREN M. Decision making by p53: life, death and cancer [J]. Cell Death Differ, 2003, 10(4): 431-442.
- [7] PORWIT - MACDONALD A, LVORY K, WILKINSON S, et al. Bcl-2 protein expression in normal human bone marrow precursors and in acute myelogenous leukemia [J]. Leukemia, 1995, 9(7): 1191-1198.

HL-60 Cells Apoptosis Induced by Low-dose Cytosine arabinoside in Vitro

DU Bing¹, ZHU Dao-yin², TANG En-jie¹

(1. Institute of Molecular Biology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China;

2. Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Cytosine arabinoside (Ara-C) is an important agent used for treatment of leukemia, but its mechanism of action at low dose is not clear, maybe is related to its effects on differentiation or apoptosis of cells. The authors investigate the relationship between bcl-2, p53 expression and apoptosis of HL-60 cells induced by low-dose cytosine arabinoside (10^{-8} M) by means of TUNEL method, flow cytometry, immunohistochemistry and in situ hybridization. The results show that low-dose Ara-C could inhibit cell growth and induce apoptosis, and the effects might be related to increase of P53 protein and decrease of bcl-2 mRNA expression.

Key words: cytosine arabinoside (Ara-C); apoptosis; HL-60 cell; bcl-2; p53

(编辑 陈移峰)

[下期摘要预告]

摩托车发动机悬挂系统降振的仿真分析

谭逢友, 何玉林, 杜 静, 张志弘

(重庆大学 机构工程学院 CAD/CAM 应用工程研究所, 重庆 400030)

摘 要: 随着摩托车向高速、大功率发展, 发动机引起的振动已经成为影响摩托车性能的主要因素之一, 针对某公司 200 ml 排量摩托车设计开发过程中出现的振动现象, 在摩托车发动机与车架之间增加弹性悬挂装置, 使悬挂系统的固有频率避开发动机的常用激振频率, 对悬挂系统进行仿真分析, 合理匹配其性能参数, 改善系统的隔振性能, 解决整车振动问题, 从而提高摩托车的乘坐舒适性。

关键词: 摩托车发动机; 悬挂系统; 降振; 仿真分析