

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.29.017

三氧化二砷诱导骨髓增生异常综合征 SKM-1 细胞凋亡机制的研究*

华海应^{1,2}, 高华强¹, 孙爱宁², 朱文艳¹, 岑建农², 吴丽丽², 姜东林^{1△}

(1. 南通大学第三附属医院血液科, 江苏无锡 214041; 2. 苏州大学第一附属医院血液科, 江苏苏州 215006)

摘 要:目的 探讨三氧化二砷(AS₂O₃)诱导骨髓增生异常综合征(MDS)SKM-1 细胞的凋亡机制。方法 将 AS₂O₃ 与 SKM-1 细胞共育,采用形态学观察细胞生长,流式细胞术检测细胞凋亡,RT-PCR 技术检测 Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA 表达。结果 0.25、0.50 μmol/L AS₂O₃ 对 SKM-1 细胞无明显促凋亡作用($P>0.05$),2.00、8.00、32.00 μmol/L AS₂O₃ 对 SKM-1 细胞有明显促凋亡作用,随着 AS₂O₃ 浓度增加及作用时间延长,凋亡发生率增加($P<0.01$),抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达下降($P<0.01$),促凋亡基因 Bax、caspase-3 mRNA 表达增加($P<0.01$, $P<0.05$)。结论 2、8、32 μmol/L AS₂O₃ 对 SKM-1 细胞有促凋亡作用,可能通过下调 Bcl-2、上调 Bax 及 caspase-3 基因表达参与其中。

关键词:骨髓增生异常综合征;三氧化二砷;细胞凋亡;Bcl-2;Bax;caspase-3

中图分类号:R551.3 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)29-3897-04

Study on the mechanism of Arsenic Trioxide inducing the apoptosis of myelodysplastic syndrome cell line SKM-1*

Hua Haiying¹, Gao Huaqiang¹, Sun Aining², Zhu Wenyan¹, Cen Jiannong², Wu Lili², Jiang Donglin^{1△}

(1. Department of Hematology, the Third Hospital Affiliated to Nantong University, Wuxi, Jiangsu 214041, China;

2. Department of Hematology, the First Hospital Affiliated to Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract:Objective To investigate the mechanism of AS₂O₃ inducing the apoptosis of myelodysplastic syndrome(MDS) cell line SKM-1. **Methods** SKM-1 cells were incubated with AS₂O₃, and then the cellular morphology was observed, flow cytometry was used to determine the apoptosis, RT-PCR was used to detect the expressions of Bcl-2, Bax and caspase-3 mRNA. **Results** 0.25, 0.50 μmol/L AS₂O₃ could not markedly induce the apoptosis of SKM-1 cells ($P>0.05$). But 2.00, 8.00, 32.00 μmol/L of AS₂O₃ could obviously promote the apoptosis of SKM-1 cells. With the increase of the acting time and concentration of AS₂O₃, the apoptosis rate increased, too($P<0.01$), the expressions of anti-apoptotic gene Bcl-2 mRNA decreased ($P<0.01$), the expressions of promoting apoptosis gene Bax and caspase-3 mRNA increased ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** 2.00, 8.00, 32.00 μmol/L of AS₂O₃ may promote the apoptosis of SKM-1 cells through down-regulating the expression of Bcl-2 gene and up-regulating the expressions of Bax and caspase-3 genes.

Key words: myelodysplastic syndromes; AS₂O₃; apoptosis; Bcl-2; Bax; caspase-3

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)是一种造血干细胞异常克隆性与异质性疾病,其共同特征是骨髓病态造血,伴有或不伴有原始细胞增多,以及无效造血,导致外周血细胞减少,高风险时向急性白血病转化^[1]。MDS 发病率有逐年上升趋势^[2],因为本病的异质性较高,现国内外惟一可能使疾病获得长期缓解的治疗是异基因造血干细胞移植^[3],但由于绝大多数患者发病年龄高、骨髓供体少,故只有少数患者可以接受此治疗,且有较高的移植相关死亡率,故 5 年无病生存率只有 29%^[3]。其他治疗常以支持和化疗为主,但疗效欠佳^[4]。三氧化二砷(AS₂O₃)系我国民间验方癌灵 1 号的主要成分之一,已被发掘治疗急性早幼粒细胞性白血病(APL),临床效果显著^[5]。近年来研究发现 AS₂O₃ 对白血病细胞株 K562 细胞有凋亡诱导作用^[6],临床报道 AS₂O₃ 治疗 MDS 有一定疗效,有效率为 20%~30%^[7]。目前对细胞凋亡及增殖的调节异常被认为是 MDS 发病机制中重要组成部分^[8],本研究以观察 AS₂O₃ 对 MDS-RAEB 细胞株 SKM-1 细胞的作用,探讨 AS₂O₃ 治疗 MDS 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和 AS₂O₃ 处理 MDS-RAEB 细胞株 SKM-1 细胞来源于日本 JCRB 细胞库(由华中科技大学附属同济医院周剑峰教授惠赠),在 37℃、5% CO₂、含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/mL)及链霉素(100 μg/mL)的 RPMI 1640 培养液(Gibco 公司)培养细胞,每 2~3 天传代 1 次,实验所用细胞均处于对数生长期,台盼蓝拒染法表明细胞活力大于 95%。实验前以 AS₂O₃ (哈尔滨伊达药业有限公司)分设不同药物浓度组:0.25、0.50、2.00、8.00、32.00 μmol/L,实验中设对照组(未经 AS₂O₃ 处理)。

1.2 细胞形态观察 药物处理后 24、48、72 h,分别在不同时间取对照组及不同药物浓度处理组的适量细胞,涂片凉干,进行瑞氏-姬姆萨染色:将瑞氏与姬姆萨两种染料滴加到涂片上,均匀覆盖,染色 2 min,滴加等量 PBS 溶液,继续染色 2 min, PBS 缓慢冲片,阴凉处风干。涂片在光学显微镜油镜下观察细胞形态。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡 在 24、48、72 h 分别收集对

* 基金项目:江苏省中医药局基金资助项目(LZ09103);无锡市中医药局基金资助项目(ZZD0802)。 作者简介:华海应(1972-),副主任医师,硕士,主要从事骨髓增生异常综合征与白血病研究。 △ 通讯作者, E-mail: jdlstar@126.com。

照组及不同浓度处理组的细胞,用 PBS 洗涤,加入 5 μ L Annexin V 和 5 μ L 碘化丙啶(PI),常温避光孵育 15 min,再加入 400 μ L 缓冲液,1 h 内用 BD FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测细胞凋亡。结果以 Annexin V 及 PI 双标记阳性细胞为凋亡细胞。

1.4 荧光定量 RT-PCR 检测 Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA 表达

1.4.1 引物设计 根据 GenBank 核酸序列,用 Premier 3.0 软件设计引物序列(上海生工公司合成)。Bcl2 正向引物:5'-AGG ATC ATG CTG TAC TTA A-3',反向引物:5'-ATG AGG CAC GTT ATT ATT AG-3';Bax 正向引物:5'-CGA ACTG GAC AGT AAC AT-3',反向引物:5'-CTC GGA AAA AGA CCT CTC-3';caspase-3:正向引物:5'-TTG TAG AAG TCT AAC TGG AA-3';反向引物:5'-CCA TGT CAT CAT CAA CAC-3';ABL(内参):正向引物:5'-GAT ACG AAG

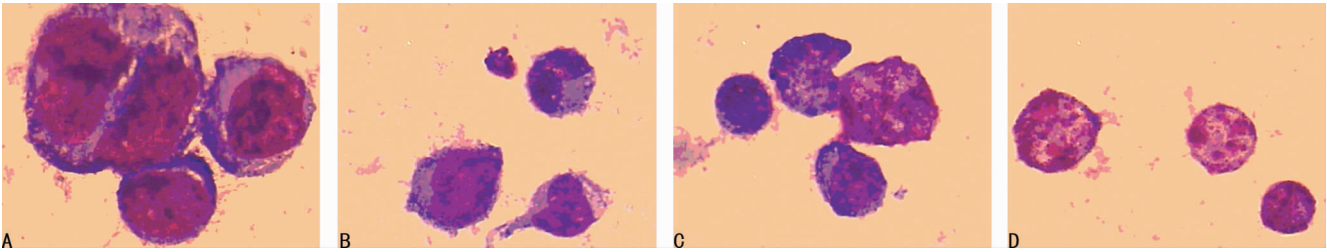
GGA GGG TGT ACC A-3',反向引物:5'-CTC GGC CAG GGT GTT GAA-3'。

1.4.2 RT-PCR 检测 用 Trizol 法提取总 RNA 并逆转录合成 cDNA。PCR 扩增条件:50 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后,95 $^{\circ}$ C 变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min 并检测荧光,循环 45 次。

1.5 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对同一样本均数间比较采用单因素方差分析;对均数两两比较,采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

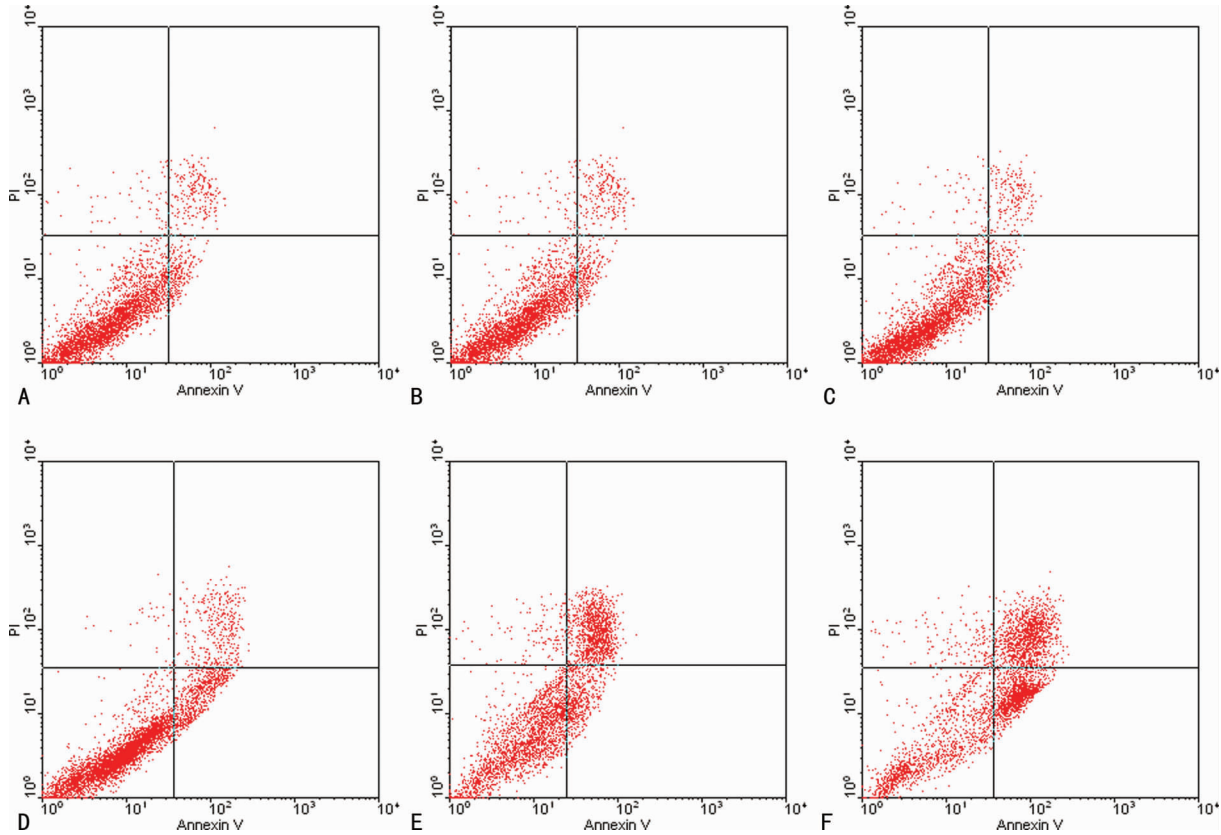
2 结 果

2.1 As_2O_3 诱导 SKM-1 细胞后形态学改变 镜下对照组及 0.25、0.50 μ mol/L As_2O_3 处理组细胞形态未见明显变化,2.00、8.00、32.00 μ mol/L 处理组见部分细胞的染色质浓缩、边缘化、细胞核膜裂解、染色质分割成块状和凋亡小体等典型凋亡形态,见图 1。



A:SKM-1 细胞;B:SKM-1 细胞核固缩;C:SKM-1 细胞核固缩与凋亡;D:SKM-1 细胞凋亡小体。

图 1 不同浓度处理 SKM-1 细胞后形态学变化(瑞士-吉姆萨染色 $\times 1\,000$)



A:0 μ mol/L(对照组);B:0.25 μ mol/L;C:0.50 μ mol/L;D:2.00 μ mol/L;E:8.00 μ mol/L;F:32.00 μ mol/L

图 2 Annexin V-PI 双标记检测 As_2O_3 作用 SKM-1 细胞 48 h 后凋亡情况

2.2 As_2O_3 诱导 SKM-1 细胞凋亡 0、0.25、0.50、2.00、8.00、32.00 μ mol/L As_2O_3 处理 SKM-1 细胞,在 24、48、72 h

表 1 AS₂O₃ 作用 SKM-1 细胞 24、48、72 h 后细胞凋亡率(*n*=5,%)

时间	0(对照组)	0.25 μmol/L	0.50 μmol/L	2.00 μmol/L	8.00 μmol/L	32.00 μmol/L
24 h	1.46±0.43	1.42±0.40	1.36±0.36	3.62±0.78 ^a	7.74±3.89 ^a	11.10±1.07 ^a
48 h	1.28±0.48	1.22±0.30	1.32±0.24	4.98±0.90 ^b	11.90±0.87 ^b	16.58±3.29 ^b
72 h	1.30±0.35	1.30±0.26	1.48±0.53	12.60±1.07 ^b	28.84±2.22 ^b	37.38±1.31 ^b

^a:*P*<0.01,相同处理时间,与对照组比较;^b:*P*<0.01,相同处理浓度,与 24 h 处理时间比较。

表 2 AS₂O₃ 作用 SKM-1 细胞 24、48、72 h 后 Bcl-2 mRNA 表达情况(*n*=5)

时间	0(对照组)	0.25 μmol/L	0.50 μmol/L	2.00 μmol/L	8.00 μmol/L	32.00 μmol/L
24 h	0.654±0.017	0.659±0.023	0.654±0.015	0.413±0.014 ^a	0.333±0.016 ^a	0.265±0.017 ^a
48 h	0.657±0.015	0.653±0.025	0.658±0.033	0.310±0.029 ^b	0.236±0.015 ^b	0.195±0.015 ^b
72 h	0.661±0.023	0.660±0.027	0.662±0.034	0.199±0.010 ^b	0.144±0.019 ^b	0.091±0.012 ^b

^a:*P*<0.01,相同处理时间,与对照组比较;^b:*P*<0.01,相同处理浓度,与 24 h 处理时间比较。

表 3 AS₂O₃ 作用 SKM-1 细胞 24、48、72 h 后 Bax mRNA 表达(*n*=5)

时间	0(对照组)	0.25 μmol/L	0.50 μmol/L	2.00 μmol/L	8.00 μmol/L	32.00 μmol/L
24 h	0.287±0.014	0.284±0.014	0.288±0.012	0.535±0.016 ^a	0.746±0.022 ^a	0.926±0.020 ^a
48 h	0.287±0.038	0.291±0.035	0.295±0.043	0.830±0.049 ^b	1.212±0.037 ^b	1.534±0.022 ^b
72 h	0.288±0.033	0.287±0.031	0.289±0.020	1.170±0.022 ^b	1.589±0.029 ^b	1.963±0.04 ^b

^a:*P*<0.01,相同处理时间,与对照组比较;^b:*P*<0.01,相同处理浓度,与 24 h 处理时间比较。

表 4 AS₂O₃ 作用 SKM-1 细胞 24h、48h、72h 后 caspase-3-mRNA 表达(*n*=5)

时间	0(对照组)	0.25 μmol/L	0.50 μmol/L	2.00 μmol/L	8.00 μmol/L	32.00 μmol/L
24 h	1.72±0.24	1.85±0.44	1.86±0.26	3.75±0.43 ^a	5.54±0.37 ^a	7.19±0.23 ^a
48 h	1.70±0.30	1.70±0.35	1.68±0.20	5.55±0.28 ^b	7.27±0.25 ^b	9.43±0.48 ^b
72 h	1.73±0.24	1.76±0.47	1.75±0.34	7.32±0.42 ^b	9.28±0.58 ^b	11.25±1.48 ^b

^a:*P*<0.05,相同处理时间,与对照组比较;^b:*P*<0.05,相同处理浓度,与 24 h 处理时间比较。

取细胞经 Annexin V-PI 双标记后上流式细胞仪检测。与对照组(0 μmol/L)比较,0.25、0.50 μmol/L AS₂O₃ 处理组细胞凋亡差异无统计学意义(*P*>0.05),其他组均有统计学意义(*P*<0.01),且随着浓度增加及作用时间延长凋亡发生率逐渐增加(*P*<0.01),见图 2、表 1。

2.3 AS₂O₃ 作用 SKM-1 细胞后 Bcl-2、Bax mRNA 的表达
0.25、0.50、2.00、8.00、32.00 μmol/L AS₂O₃ 处理 SKM-1 细胞,分别在 24 h、48 h、72 h 时取细胞检测 Bcl-2、Bax mRNA 表达。与对照组比较,0.25、0.50 μmol/L AS₂O₃ 处理组 Bcl-2、Bax mRNA 表达差异无统计学意义(*P*>0.05),其他组差异均有统计学意义(*P*<0.01),且随着 AS₂O₃ 浓度增加及作用时间延长 Bcl-2 mRNA 表达水平逐渐下降(*P*<0.01),见表 2,Bax mRNA 表达水平则逐渐上升(*P*<0.01),见表 3。

2.4 AS₂O₃ 作用 SKM-1 细胞后 caspase-3 mRNA 的表达
0.25、0.50、2.00、8.00、32.00 μmol/L AS₂O₃ 处理 SKM-1 细胞,分别在 24、48、72 h 时取细胞检测 caspase-3 mRNA 表达。与对照组比较,0.25、0.50 μmol/L AS₂O₃ 处理组 caspase-3 mRNA 表达差异无统计学意义(*P*>0.05),其他组差异均有统计学意义(*P*<0.05),且随着 AS₂O₃ 浓度增加及作用时间延长 caspase-3 mRNA 表达水平逐渐上升(*P*<0.05),见表 4。

3 讨 论

MDS 作为恶性克隆性造血干细胞疾病,高危患者易向急

性白血病转化,其发病机制十分复杂。研究发现 MDS 早期可见异常克隆和正常克隆并存,骨髓造血表现为高增殖及高凋亡,到晚期则以异常克隆增殖为主,骨髓造血以高增殖低凋亡为主要表现^[9]。Bcl-2 蛋白家族是凋亡的主要调节者,包括抗凋亡的 Bcl-2、Bcl-xL 及促凋亡的 Bax、Bad、Bid 等两大亚家族,Bcl-2/Bax 比率是影响细胞凋亡的关键,Bax/Bax 二聚体在体内过量表达时,可促进细胞凋亡。caspase-3 是 caspase 家族中的最重要的凋亡执行者之一,是细胞凋亡过程中的主要效应因子,它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志^[10]。AS₂O₃ 对人体有很强的毒性作用,属于剧毒物质,但该物质在祖国医药中却可用来治疗牛皮癣、梅毒及风湿病等。近些年随着对中医理论的研究,AS₂O₃ 更被用来治疗一些肿瘤疾病,特别是急性早幼粒细胞性白血病^[5],发现它可通过下调 Bcl-2、上调 Bax 与 caspase-3 基因来诱导其他非早幼粒细胞性白血病细胞及实体肿瘤细胞凋亡^[-6,11-13]。

本研究将不同浓度的 AS₂O₃ 与 MDS-RAEB 细胞株 SKM-1 细胞共育,观察细胞凋亡情况。研究发现除 0.25、0.50 μmol/L 处理组与对照组比较差异无统计学意义(*P*>0.05),其他组(2.00 μmol/L 及以上浓度 AS₂O₃ 组)均出现典型细胞凋亡形态学的改变,且细胞凋亡发生率与对照组比较差异有统计学意义(均 *P*<0.05),且处理组随着 AS₂O₃ 浓度增加及作用时间延长凋亡发生率逐渐增加,说明 2.00 μmol/L 及

以上浓度 As_2O_3 均能诱导 SKM-1 细胞凋亡,抑制 SKM-1 细胞生长,并呈剂量与时效关系;进一步检测了 Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA 表达,与对照组比较,三者 在 0.25、0.50 $\mu\text{mol/L}$ 处理时差异无统计学意义($P>0.05$),而 2.00 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度 As_2O_3 组差异均有统计学意义($P>0.05$),且随着 As_2O_3 浓度增加及作用时间延长 Bcl-2 mRNA 表达逐渐下降,而 Bax、caspase-3 mRNA 表达则逐渐上升,说明 2.00 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度 As_2O_3 即可通过下调 Bcl-2 基因和上调 Bax、caspase-3 基因表达来发挥诱导 SKM-1 细胞凋亡的作用。

综上所述, As_2O_3 抑制 SKM-1 细胞增殖主要通过促进细胞凋亡来实现,具有效应浓度的 As_2O_3 可能是通过下调 Bcl-2 基因与上调 Bax、caspase-3 基因来发挥作用。下一步将继续深入研究 As_2O_3 在细胞凋亡途径中的具体作用及其对细胞周期的影响,进一步探讨 As_2O_3 诱导 MDS 细胞凋亡的具体机制。

参考文献:

- [1] Nimer SD. Myelodysplastic syndromes[J]. Blood, 2008, 111(10):4841-4851.
- [2] Ma XM. Epidemiology of myelodysplastic syndromes[J]. Am J Med, 2012, 125(7, Supplement):S2-S5.
- [3] Warlick ED, Cioc A, Defor T, et al. Allogeneic stem cell transplantation for adults with myelodysplastic syndromes; importance of pretransplant disease burden[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2009, 15(1):30-38.
- [4] Greenberg PL. Molecular and genetic features of myelodysplastic syndromes[J]. Int J Lab Hematol, 2012, 34(3):215-222.
- [5] Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, et al. Use of Arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients[J]. Blood, 1997, 89(9):3354-3360.

- [6] Wang DH, Wei HL, Zhao HS, et al. Arsenic trioxide overcomes apoptosis inhibition in K562/ADM cells by regulating vital components in apoptotic pathway[J]. Pharmacol Res, 2005, 52(5):376-385.
- [7] Schiller GJ, Slack J, Hainsworth JD, et al. Phase II multicenter study of Arsenic trioxide in patients with myelodysplastic syndromes[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(16):2456-2464.
- [8] Kerbauiy DB, Deeg HJ. Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome[J]. Exp Hematol, 2007, 35(11):1739-1746.
- [9] Barzi A, Sekeres MA. Myelodysplastic syndromes; a practical approach to diagnosis and treatment[J]. Cleve Clin J Med, 2010, 77(1):37-44.
- [10] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. Methods Mol Biol, 2008, 414:13-21.
- [11] Xia J, Li Y, Yang Q, et al. Arsenic trioxide inhibits cell growth and induces apoptosis through inactivation of notch signaling pathway in breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(8):9627-9641.
- [12] 王绩英, 赵雪强, 王昌明, 等. 三氧化二砷逆转 A549 细胞对 TRAIL 耐药的研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(7):676-678.
- [13] Yedjou C, Tchounwou P, Jenkins J, et al. Basic mechanisms of Arsenic trioxide (ATO)-induced apoptosis in human leukemia (HL-60) cells[J]. J Hematol Oncol, 2010, 3:28.

(收稿日期:2014-04-08 修回日期:2014-06-22)

(上接第 3896 页)

- [7] Bosch FN. The causal relationship between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4):244-265.
- [8] Ho GY, Einstein MH, Romney SL, et al. Risk factors for persistent cervical intraepithelial neoplasia grades 1 and 2; managed by watchful waiting[J]. J Low Genit Tract Dis, 2011, 15(4):268-275.
- [9] Sun CA, Lai HC, Chang CC, et al. The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix[J]. Gynecol Oncol, 2001, 83(1):95-99.
- [10] 李军果, 李力, 郭建新, 等. 375 例宫颈病变患者高危型人乳头瘤病毒感染研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(9):935-936, 939.
- [11] Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive

cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia; a randomised controlled trial[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(3):249-257.

- [12] Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, et al. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia; 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(1):89-99.
- [13] 刘昱, 祁文娟, 魏丽惠. HPV 预防性疫苗在预防子宫颈癌中的应用进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2013(4):378-381.
- [14] Martin-Hirsch PP, Paraskevaides E, Bryant A, et al. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2010(6):CD001318.

(收稿日期:2014-05-10 修回日期:2014-06-14)