论著

文章编号:1000-5404(2012)15-1492-04

阿糖胞苷诱导人MDS细胞株MUTZ-8细胞凋亡过程中活性氧水平的变化

罗 静[1],叶兴伟[2],蒋 文[1],周洪静[1],杨泽松[1],刘 林[1],王 利[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血液科[1];400015 重庆,重庆医科大学附属第一医院第一分院超声科[2])

[摘要] **目的** 探讨阿糖胞苷诱导人MDS细胞株MUTZ-8细胞凋亡的可能机制。**方法** 将细胞分为以下5组:阴性对照组、0.1 μmol/L Ara-c组、1 μmol/L Ara-c组、10 μmol/L Ara-c组、10 μmol/L Ara-c+62.5 μmol/L ALA组。用MTT法测定阿糖胞苷对各组细胞抑制率的影响,用Annexin V-FITC/PI双染法及Hoechst33258荧光染色观察阿糖胞苷对各组细胞凋亡的影响,并用流式细胞仪检测各组细胞线粒体膜电位的变化。运用二氢二氯荧光素(DCFH-DA)为细胞内活性氧探针,通过荧光显微镜及流式细胞仪检测各组细胞内活性氧水平的变化。**结果** MTT结果提示,阿糖胞苷处理组细胞增殖抑制率高于阴性对照组,二者相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。流式细胞仪结果提示,不同浓度的阿糖胞苷作用MUTZ-8细胞后,凋亡率明显升高,线粒体膜电位明显下降,与阴性对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$)。流式细胞仪及荧光显微镜检测均显示,阿糖胞苷作用后细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)明显上升。而加入抗氧化剂α-硫辛酸后细胞内ROS表达水平下降。**结论** 阿糖胞苷明显抑制了人MDS细胞株MUTZ-8的生长并诱导其凋亡,可能与阿糖胞苷影响了细胞内ROS水平有关。

[关键词] 细胞凋亡;阿糖胞苷;MUTZ-8;骨髓增生异常综合征;活性氧
[中图法分类号] R73-361;R737.3;R979.12 [文献标志码] A

Alteration of reactive oxygen species in cytarabine-induced apoptosis process in MDS cell line MUTZ-8

Luo Jing[1], Ye Xingwei[2], Jiang Wen[1], Zhou Hongjing[1], Yang Zesong[1], Liu Lin[1], Wang Li[1] ([1]Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Ultrasonography, First Branch of First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the possible underlying mechanism of apoptosis in MUTZ-8 cells induced by cytarabine. **Methods** The cells were divided into 5 groups, negative control group, 0.1 μmol/L Ara-c group, 1 μmol/L Ara-c group, 10 μmol/L Ara-c group, and 10 μmol/L Ara-c + 62.5 μmol/L ALA group. The proliferation of MUTZ-8 cells in above groups was measured by MTT assay. Apoptotic rate was assessed by Annexin V/PI double staining and luminescent dyes-Hoechst33258. Mitochondrial membrane potential of the cells was determined by flow cytometry. Using a ROS probe (2′,7′-dichlo-rofluorescein diacetate, DCFH-DA), the level of reactive oxygen species (ROS) was detected by flow cytometry and fluorescence microscopy. **Results** MTT assay indicated cytarabine resulted in a stronger inhibition in cell viability when compared with the cells of negative control group ($P<0.05$). Apoptotic rates of the cells in cytarabine groups were significantly increased as compared with negative control group ($P<0.05$). Mitochondrial membrane potential levels of the cells were decreased in cytarabine groups as compared with negative control group ($P<0.05$). ROS levels in all cytarabine groups were up-regulated as compared with negative control group ($P<0.05$). **Conclusion** Cytarabine effectively inhibits the growth and induces the apoptosis in MUTZ-8 cells, which might be related to the elevation of ROS level.

[**Key words**] apoptosis; cytarabine; MUTZ-8 cells; myelodysplastic syndrome; reactive oxygen species

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30971277) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2009JJ0424). Corresponding author: Wang Li, Tel: 86-23-89012014, E-mail: liwangls@yahoo.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30971277);重庆市自然科学基金(2009JJ0424)
[通信作者] 王 利,电话:(023)89012014,E-mail:liwangls@yahoo.com

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是一组起源于多能造血干/祖细胞的异质性恶性疾病,主要表现为病态造血、难治性血细胞减少,以高风险向急性白血病转化为其特征。目前MDS发病率有增高趋势,但对其缺乏有效的治疗手段,即使对高危组患者进行异基因造血干细胞移植,平均生存期也仅为5~12个月[1]。因此,寻找有效、经济、副作用小的药物成为近年来MDS基础和临床研究的热点。

阿糖胞苷(cytosine arabinoside, Ara-C)是胞苷和去氧胞苷类抗代谢药,主要通过抑制细胞DNA的合成,达到干扰细胞增殖。传统观念认为阿糖胞苷是周期特异性药物,而近几年的研究报道认为阿糖胞苷对静止期及增殖期肿瘤细胞均有促凋亡作用[2]。由于其广谱的抗肿瘤活性,因此成为治疗恶性肿瘤最常用的化疗药物之一,更是许多血液系统肿瘤化疗方案的核心药物,但其抗肿瘤的分子机制尚不十分清楚。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)可以影响细胞的生长周期、细胞迁移、基因突变以及细胞对药物的敏感性等。活性氧存在于多条细胞生长因子信号通路中,与细胞生长、增殖、迁移、转移、药物耐受等密切相关,在药物诱导的肿瘤细胞凋亡中起着重要作用[3-7]。目前,活性氧在凋亡中的作用越来越受到重视。阿糖胞苷在抗肿瘤细胞的过程中,是否与活性氧有关,尚少见相关报道。本实验采用阿糖胞苷体外作用于人MDS细胞株MUTZ-8细胞,比较不同浓度的阿糖胞苷对MUTZ-8细胞的增殖以及诱导凋亡的影响。进一步观察阿糖胞苷诱导MUTZ-8细胞凋亡过程中活性氧水平的变化,以及加入抗氧化剂后细胞生长抑制率、凋亡率及活性氧水平的变化,初步探讨阿糖胞苷对MUTZ-8细胞增殖、凋亡的影响,以及活性氧在阿糖胞苷诱导MUTZ-8凋亡过程中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

MUTZ-8细胞株(德国DMSZ研究所Drexler教授惠赠);阿糖胞苷(Sigma),相对分子质量为243.22。Annexin V/PI试剂盒和胎牛血清购自美国Gibco公司;α-MEM培养液购自美国HyClone公司;IL-3、GM-CSF和SCF细胞生长因子购自Peprotech公司;流式细胞仪FACS Calibur购自美国BD公司;倒置荧光显微镜购自德国Leica公司;二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT)购自Sigma公司;Hoechst33258染色试剂盒和α-硫辛酸(ALA)以及活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所,罗丹明-123购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养于含20%胎牛血清,10 ng/ml SCF、GM-SCF、IL-3的α-MEM培养液中,于37 ℃,5%的CO_2饱和湿度孵箱中培养,3~5 d换液传代1次,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.2 MTT法检测 取对数生长期MUTZ-8细胞,调整细胞密度为2×10^4/ml,接种于96孔板,每孔加入细胞悬浮液200 μl,于37 ℃,5%的CO_2饱和湿度孵箱中培养,培养24 h后离心弃去全培养液,加入含0.1、1、10 μmol/L浓度阿糖胞苷以及10 μmol/L的Ara-c+62.5 μmol/L的ALA的培养液于细胞中,同时设立阴性对照及空白对照组,每组设4个复孔,在药物分别作用24、48、72 h后,每孔加入5 g/L MTT溶液20 μl,培养4 h后,在1 000 r/min的条件下,离心10 min,弃上清,所有孔均加入150 μl的DMSO,于振荡器上振荡15 min,待颗粒完全溶解后,在酶标仪570 nm波长处测定每孔D(570)值。按照公式计算细胞抑制率。细胞抑制率(%)=[1-实验组D(570)值/对照组D(570)值]×100%。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI双染标记法检测 收集对数生长期细胞,调整细胞密度为5×10^5/ml,接种于6孔板,并设立对照组,实验组分别加入0.1、1、10 μmol/L不同浓度的阿糖胞苷以及10 μmol/L的Ara-c+62.5 μmol/L的ALA,作用MUTZ-8细胞48 h后,在2 000 r/min的条件,离心5 min后,弃上清,用4 ℃预冷的PBS洗涤细胞2次,在离心弃上清收集细胞后,进行Annexin V-FITC/PI双染标记法检测,染色按照试剂盒说明书进行操作。根据Annexin V-FITC(X轴)/PI(Y轴)荧光做对数散点图,可获得由4个象限组成的双参数图左下象限为活细胞,右下象限为早期凋亡细胞,左上象限为细胞收集过程中产生的损伤细胞,右上象限为晚期凋亡细胞和坏死细胞,每个象限的细胞数即为受检总细胞数中所占的比例。

1.2.4 Hoechst33258染色观察细胞核凋亡形态 收集正常培养和10 μmol/L的Ara-c处理48 h后的细胞于载玻片上,经40 g/L的多聚甲醛在室温固定30 min后,用PBS洗3次,滴加Hoechst33258染色,染色5 min,滴加抗荧光淬灭液于载玻片上,用盖玻片封片,在荧光显微镜下观察细胞凋亡形态。

1.2.5 细胞内活性氧水平测定 用二氢二氯荧光素(DCFH-DA)探针检测ROS。本身没有荧光的DCFH-DA可穿过细胞膜进入细胞,在细胞内ROS存在的条件下被氧化生成荧光物质二氯荧光黄(DCF),其荧光强度与细胞内ROS水平成正相关性。按活性氧检测试剂盒说明将生长在6孔板中的细胞经上述分组培养后,吸弃板内培养液,每孔滴加1 ml终浓度为10 μmol/L的DCFH-DA,37 ℃细胞培养箱内避光孵育20 min后,分别用倒置荧光显微镜进行定性观察及使用流式细胞仪进行定量检测各组细胞荧光强度,以荧光强度反映细胞内ROS水平。DCFH-DA荧光探针激发波长为488 nm,发射波长为525 nm。

1.2.6 线粒体膜电位的测定 收集1×10^6个细胞,用PBS洗涤后,加入1.0 ml的D-Hanks液悬浮,加入10 μl 2.5 mmol/L的罗丹明-123,使其终浓度为25 μmol/L,在37 ℃、5%CO_2培养箱内避光孵育30 min,用PBS洗涤3次,流式细胞仪检测分析。

1.3 统计学处理

采用SPASS 17.0统计软件进行分析,数据以$\bar{x}\pm s$表示,各组间采用单因素方差分析对所得数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 Ara-c对MUTZ-8细胞增殖的影响

MTT检测结果显示，阿糖胞苷0.1、1、10 μmol/L作用MUTZ-8细胞24、48、72 h后细胞的增殖下降，与阴性对照组相比较差异具有统计学意义（$P<0.05$）。加用抗氧化剂α-硫辛酸（ALA）后MUTZ-8细胞的增殖下降，与未加抗氧化剂组相比较差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见表1。

表1 MTT检测各组阿糖胞苷对MUTZ-8细胞生长抑制率的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	剂量（μmol/L）	24 h	48 h	72 h
阴性对照组	0	0	0	0
Ara-c组	0.1	15.477±2.303[a]	18.838±2.491[a]	25.413±2.470[a]
	1	20.591±1.420[a]	25.121±1.491[a]	32.605±2.788[a]
	10	25.853±2.612[a]	51.168±4.192[a]	51.267±4.270[a]
Ara-c+ALA组	10+62.5	19.805±1.286[ab]	34.654±2.798[ab]	40.203±2.371[ab]

a：$P<0.05$，与阴性对照组比较；b：$P<0.05$，与10 μmol/L Ara-c组比较

2.2 Ara-c对MUTZ-8细胞凋亡的影响

阿糖胞苷0.1、1、10 μmol/L作用MUTZ-8细胞48 h后凋亡率随阿糖胞苷浓度的提高而增加，与阴性对照组相比较，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；10 μmol/L的Ara-c组加入抗氧化剂后凋亡率下降，与10 μmol/L的Ara-c未加抗氧化剂组凋亡率相比较，差异具有统计学意义（$P<0.05$，表2）。

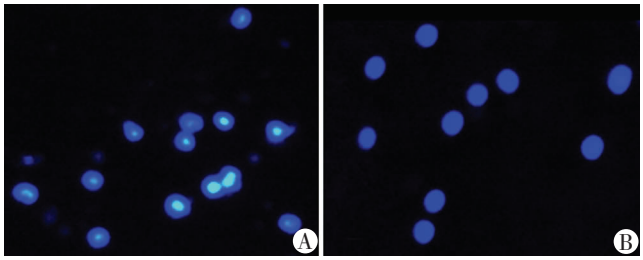
表2 阿糖胞苷作用48 h对各组MUTZ-8细胞凋亡率的影响（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	剂量（μmol/L）	细胞凋亡率
阴性对照组	0	4.404±0.830
Ara-c组	0.1	14.118±2.020[a]
	1	19.702±1.574[a]
	10	31.096±2.304[a]
Ara-c+ ALA组	10+62.5	21.119±2.267[b]

a：$P<0.05$，与阴性对照组比较；b：$P<0.05$，与10 μmol/L Ara-c组比较

2.3 阿糖胞苷诱导MUTZ-8细胞凋亡的形态学变化

Hoechst33258荧光染色图片显示，阴性对照组细胞核膜完整，核呈圆形或椭圆形，染色质分布较均匀，细胞核为蓝色均匀淡染。10 μmol/L的Ara-c作用MUTZ-8细胞48 h后，部分细胞出现核体积变小，核固缩，细胞核出现碎裂，呈现致密的蓝色颗粒状荧光，表现为典型的细胞凋亡形态学改变，表明阿糖胞苷可以诱导MUTZ-8细胞凋亡。见图1。

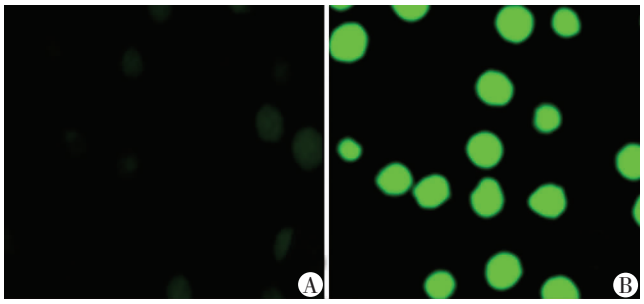


A：10 μmol/L Ara-c组作用48 h后；B：阴性对照组

图1 荧光显微镜观察Hoechst33258染色的变化（×100）

2.4 阿糖胞苷对MUTZ-8细胞活性氧的影响

不同浓度阿糖胞苷作用MUTZ-8后48 h，倒置荧光显微镜下观察各组细胞内活性氧水平，以荧光强度反映ROS水平。阴性对照组荧光强度较微弱，ROS最低，处理组细胞内活性氧水平明显高于阴性对照组（图2）；流式细胞仪检测各组细胞活性氧水平，阿糖胞苷处理后细胞内活性氧水平增加，处理组活性氧水平与阴性对照组相比，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见表3。



A：阴性对照组；B：10 μmol/L Ara-c组作用48 h后

图2 荧光显微镜观察MUTZ-8细胞活性氧水平（×100）

表3 阿糖胞苷对各组MUTZ-8细胞ROS的影响（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	剂量（μmol/L）	ROS
阴性对照组	0	51.447±8.815
Ara-c组	0.1	114.545±12.508[a]
	1	157.581±10.800[a]
	10	286.930±12.958[a]
Ara-c+ ALA组	10+62.5	166.707±11.781[ab]

a：$P<0.05$，与阴性对照组比较；b：$P<0.05$，与10μmol/L Ara-c组比较

2.5 阿糖胞苷对MUTZ-8细胞线粒体膜电位的影响

流式细胞仪检测线粒体膜电位，检测结果表明，阿糖胞苷作用MUTZ-8细胞48 h后，细胞线粒体膜电位明显下降，较阴性对照组相比，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。加入抗氧化剂后，细胞线粒体膜电位下降，与同一阿糖胞苷浓度作用下的线粒体膜电位相比较，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见表4。

表4 阿糖胞苷作用48 h对各组MUTZ-8细胞线粒体膜电位的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	剂量（μmol/L）	线粒体膜电位
阴性对照组	0	130.7±2.902
Ara-c组	0.1	110.3±2.902[a]
	1	80.6±2.159[a]
	10	68.7±2.706[a]
Ara-c+ ALA组	10+62.5	75.2±1.861[ab]

a：$P<0.05$，与阴性对照组比较；b：$P<0.05$，与10 μmol/L Ara-c组比较

3 讨论

活性氧是一类异质性分子，包括超氧化物氢离子，过氧化氢（H_2O_2）及羟自由基（·OH）等，致癌因素的刺激、线粒体功能紊乱、促凋亡信号等因素均可以导致ROS增多。多种病理状态下可呈现出活性氧水平升

高,反之,过度的ROS水平亦可损坏细胞的DNA、蛋白及脂质成分等,导致细胞凋亡[8]。细胞内环境氧化还原状态平衡对于细胞的生存和增殖至关重要,破坏细胞氧化还原状态可以导致疾病的发生。大多数肿瘤细胞内的ROS处于活跃状态,研究[9-10]已证实AML、CML、MDS等细胞中ROS呈现出高水平。进一步提高肿瘤细胞内的ROS水平,可以促进肿瘤细胞凋亡,达到治疗的目的。因此,增加ROS水平、抑制抗氧化系统可能成为治疗肿瘤的又一新的途径[11]。研究[12-13]发现许多抗肿瘤药物如蒽环类抗生素、三氧化二砷、拓扑异构酶Ⅱ抑制剂Salvicine、甲氧雌二醇等,诱导肿瘤细胞凋亡其作用均与ROS密切相关。Hahm等[14]在研究醉茄素A抗乳腺癌细胞的作用机制中亦发现,醉茄素A通过ROS介导对乳腺癌细胞的凋亡。

细胞的过度增殖及凋亡受阻导致了肿瘤的发生,因此抑制细胞增殖、促进细胞凋亡成为肿瘤治疗的有效方法之一。有些抗癌药物通过干扰细胞的周期抑制细胞增殖,有些药物则通过促进凋亡来使癌细胞死亡。阿糖胞苷是治疗恶性肿瘤的重要药物之一,其主要通过诱导肿瘤细胞凋亡起到治疗作用。活性氧是否在阿糖胞苷诱导白血病细胞凋亡过程中起作用,尚少见相关报道。

线粒体途径是阿糖胞苷介导白血病细胞凋亡的核心途径,线粒体是活性氧产生的一个重要部位,阿糖胞苷作用肿瘤细胞后使线粒体膜电位下降,线粒体膜电子传递链受损,电子不能经cyt-c传递给氧,使氧不能与氢离子结合形成水,使ROS过度形成,ROS形成后导致线粒体膜电位进一步下降,形成恶性循环,导致凋亡的发生。

在本研究中,我们通过MTT法证实阿糖胞苷对MDS细胞株MUTZ-8增殖有明显抑制作用,Annexin V-FITC/PI法证实阿糖胞苷对MUTZ-8的凋亡有明显促进作用,Hoechst33258染色亦表明MUTZ-8细胞在阿糖胞苷作用下出现胞体变小、核固缩、核碎裂等典型的细胞凋亡形态学特征。因此我们有理由认为阿糖胞苷可以促MDS细胞株MUTZ-8细胞凋亡。另一方面,我们通过对各组细胞的活性氧水平测定表明,人MDS细胞株MUTZ-8细胞在不同浓度阿糖胞苷的作用下,其细胞内ROS荧光强度升高,且随阿糖胞苷剂量的增加而升高,呈剂量依赖性。抗氧化剂硫辛酸可以降低阿糖胞苷诱导的MUTZ-8细胞内的ROS水平及凋亡率,进一步证实了ROS在阿糖胞苷诱导MUTZ-8细胞凋亡过程中的作用。

综上所述,阿糖胞苷是一个有效的治疗MDS的药物,它不仅可以抑制MDS细胞的增殖,还可以诱导其凋亡。ROS在阿糖胞苷诱导MDS细胞凋亡过程中起着很重要的作用。ROS作为阿糖胞苷诱导MDS细胞凋亡过程中新的分子机制的发现,为我们治疗MDS提供了新的方法,新的思路。

志谢 感谢眼科学重庆市市级重点实验室在本研究中予以的支持

参考文献:

[1] Sekeres M A. The epidemiology of myelodysplastic syndromes[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2010, 24(2): 287-294.

[2] de-Vries J F, Falkenburg J H, Willemze R, *et al*. The mechanisms of Ara-C-induced apoptosis of resting B-chronic lymphocytic leukemia cells[J]. Haematologica, 2006, 91(7): 912-919.

[3] Ziech D, Franco R, Pappa A, *et al*. Reactive oxygen species (ROS)—induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis[J]. Mutat Res, 2011, 711(1/2): 167-173.

[4] Achuthan S, Santhoshkumar T R, Prabhakar J, *et al*. Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species[J]. J Biol Chem, 2011, 286(43): 37813-37829.

[5] Liu L, Chen C, Gong W, *et al*. Epoxyeicosatrienoic acids attenuate reactive oxygen species level, mitochondrial dysfunction, caspase activation, and apoptosis in carcinoma cells treated with arsenic trioxide[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 339(2): 451-463.

[6] Antosiewicz J, Ziolkowski W, Kar S, *et al*. Role of reactive oxygen intermediates in cellular responses to dietary cancer chemopreventive agents[J]. Planta Med, 2008, 74(13): 1570-1579.

[7] 常徽, 糜漫天, 顾艳艳, 等. 黑米花色苷对白血病细胞株HL-60及正常淋巴细胞活性氧及线粒体膜电位的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 585-587.

[8] Zhang Q, Ma Y, Cheng Y F, *et al*. Involvement of reactive oxygen species in 2-methoxyestradiol-induced apoptosis in human neuroblastoma cells[J]. Cancer Lett, 2011, 313(2): 201-210.

[9] Sallmyr A, Fan J, Rassool F V. Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair[J]. Cancer Lett, 2008, 270(1): 1-9.

[10] Hole P S, Darley R L, Tonks A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? [J]. Blood, 2011, 117(22): 5816-5826.

[11] Pan J, She M, Xu Z X, *et al*. Farnesyltransferase inhibitors induce DNA damage *via* reactive oxygen species in human cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3671-3681.

[12] Meng L H, Ding J. Salvicine, a novel topoisomerase II inhibitor, exerts its potent anticancer activity by ROS generation[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(9): 1460-1465.

[13] Gao N, Rahmani M, Shi X, *et al*. Synergistic antileukemic interactions between 2-medroxyestradiol (2-ME) and histone deacetylase inhibitors involve Akt down-regulation and oxidative stress[J]. Blood, 2006, 107(1): 241-249.

[14] Hahm E R, Moura M B, Kelley E E, *et al*. Withaferin A-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23354.

(**收稿**:2012-01-29;**修回**:2012-03-04)

(编辑 王 红)