论著

文章编号:1000-5404(2014)18-1886-04

低浓度雷公藤甲素增强去甲氧柔红霉素杀伤急性髓细胞白血病干细胞的能力

何 涵,柳约坚,陈菲莉,查 洁,周 勇,周淑芸,徐 兵 (510515 广州,南方医科大学南方医院血液科)

[摘要] **目的** 探讨低浓度雷公藤甲素(triptolide,TPL)能否增强去甲氧柔红霉素(idarubicin,IDA)杀伤急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia,AML)干细胞的能力及与Nrf2通路的关系。**方法** 流式细胞仪从KG1a细胞株中分选$CD34^+CD38^-$亚群,将其作为AML干细胞模型;MTT检测TPL单药组、IDA单药组、TPL+IDA组处理AML干细胞72 h后细胞抑制率和CI指数;Western blot检测IC_{20}浓度的TPL(5 nmol/L)、IC_{50}浓度的IDA(27 nmol/L)单药及上述浓度的TPL联合IDA作用AML干细胞后Nrf2蛋白表达水平的变化;实时荧光定量PCR检测各组处理后Nrf2及其下游基因NQO1、GSR、HO-1的mRNA表达水平的变化。**结果** MTT结果显示TPL和IDA单药对AML干细胞具有一定的增殖抑制作用,72 h的IC_{50}值分别为(20.48±1.60)nmol/L和(285.20±13.74)nmol/L;而小剂量TPL(IC_{20}值,5 nmol/L)与不同浓度IDA联合作用于AML干细胞后的增殖抑制作用显著高于IDA单药,IC_{50}值也从IDA单药的(285.20±13.74)nmol/L下降到双药联合(27.01±0.73)nmol/L,差异有统计学意义($P<0.01$)。联合作用指数CI值提示两药合用具有强协同作用。Western blot检测结果显示TPL联合IDA处理AML干细胞后Nrf2蛋白表达水平降低。定量PCR检测结果显示,TPL联合IDA处理AML干细胞后Nrf2及其下游基因NQO1、GSR及HO-1的mRNA表达水平均显著下降($P<0.01$)。**结论** 低浓度TPL能显著增强IDA对AML干细胞的杀伤作用,其机制可能与下调Nrf2通路相关。

[关键词] 急性髓细胞白血病干细胞;雷公藤甲素;IDA
[中图法分类号] R73-361;R733.71;R979.1 [文献标志码] A

Low dose triptolide enhancing cytotoxicity of idarubicin in acute myeloid leukemia stem cells

He Han, Liu Yuejian, Chen Feili, Zha Jie, Zhou Yong, Zhou Shuyun, Xu Bing (Department of Hematology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine of the ability of low dose triptolide (TPL) enhancing the cytotoxicity of idarubicin (IDA) in acute myeloid leukemia (AML) stem cells and its relationship with Nrf2 pathway. **Methods** The $CD34^+CD38^-$ KG1a cells were isolated from KG1a cells with flow cytometry and served as an AML stem cell model. The $CD34^+CD38^-$ KG1a cells were subjected to different treatments (TPL, IDA, and TPL+IDA) and thereafter detected by MTT assay. Western blotting was used to determine the expression changes of Nrf2 after the treatments. RT-PCR was used to detect the mRNA levels of Nrf2 and its target genes including NQO1, GSR and HO-1. **Results** The proliferation of $CD34^+CD38^-$ KG1a cells was inhibited by TPL and IDA separately with the 72 h IC_{50} value of 20.48±1.60 nmol/L and 285.20±13.74 nmol/L, respectively. Low dose TPL (5 nmol/L) plus IDA showed higher cytotoxicity to $CD34^+CD38^-$ KG1 cells than IDA alone, with 72h IC_{50} value of 27.01±0.73 nmol/L ($P<0.01$). Combination analysis showed synergistic effects of TPL and IDA. Western blot results displayed that Nrf2 expression was down-regulated in the cells treated with TPL combined with IDA. The mRNA expression of Nrf2 and downstream genes including NQO1, GSR, and HO-1 mRNA was decreased after TPL and IDA combined treatment ($P<0.01$). **Conclusion** Low dose TPL may significantly enhance the cytotoxicity of IDA in AML stem cells through Nrf2 pathway.

[**Key words**] triptolide; idarubicin; acute myeloid leukemia; stem cells; Nrf2 pathway

Supported by the National Nature Science Foundation of China (81070425) and the Science and Technology Program of Guangdong Province (2011B031800063). Corresponding author: Xu Bing, Tel:86-20-61641616, E-mail: xubingzhangjian@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81070425);广东省科技计划项目(2011B031800063)
[通信作者] 徐 兵,电话:(020)61641616,E-mail:xubingzhangjian@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140701.1238.011.html(2014-07-01)

急性白血病是青少年和35岁以下成年人发病率最高的恶性肿瘤,其中急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia,AML)是成人急性白血病最常见的类型。目前AML完全缓解率可达70%左右,仍有30%患者无法取得缓解,称为难治AML,而缓解的AML即使行标准的巩固治疗,多数患者仍会复发,一旦复发,预后差。因此,难治复发是目前导致AML治疗失败的最根本原因。研究发现AML干细胞与AML的难治复发存在着密切的相关性,寻找直接针对AML干细胞的治疗有望成为最终治愈AML的关键[1]。

NF-E2相关因子2(NF-E2-related factor 2,Nrf2)是在抗氧化应答中起到重要作用的一种转录因子。研究表明Nrf2的稳定表达可诱导白血病干细胞产生,因此Nrf2可能是清除AML干细胞的一个潜在靶标[2]。雷公藤甲素(triptolide,TPL)是从卫矛科雷公藤属雷公藤等植物中分离出的一种环氧化二萜类内酯化合物,TPL具有较强的抗肿瘤作用,但由于其具有的非特异性毒性及较低的治疗指数[3],限制了其单药在肿瘤治疗中的应用。研究发现低浓度TPL具有与化疗药物协同的抗肿瘤作用,能逆转肿瘤细胞的耐药,显著提高化疗药物的效果[4]。去甲氧柔红霉素(idarubicin,IDA)是一种较新的治疗AML的蒽环类化疗药物,我们前期研究发现了IDA较柔红霉素对高表达多药耐药基因1(multidrug resistance gene 1,MDR1)的AML患者在治疗上表现出了明显的优势[5]。由于AML干细胞存在MDR1高表达,提示IDA可能较其他常规化疗药物具有一定的优势。本研究探讨低浓度TPL与IDA联合应用是否能作为杀伤AML干细胞的一种新的治疗方案及与Nrf2通路关系,旨在为将来临床治疗的应用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂

TPL购自Sigma英国公司,IDA购自美国辉瑞公司日本分公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)及二甲基亚砜购自美国Saldrich公司,IMDM培养基及胎牛血清购自澳洲HyClone公司,IL-3、rhIL-3、重组人粒细胞集落刺激因子、rhSCF与重组人FLT3配基购自英国Peprotech公司。TRIzol Reagent、PrimeScript™RT定量PCR试剂盒及SYBR Premix *Ex Taq*定量PCR试剂盒购自日本塔克拉公司,焦碳酸二乙酯DEPC水购自Amersco美国公司,鼠抗人Nrf2多克隆抗体(一抗)购自Cell Signaling Techonology公司,羊抗鼠多克隆抗体(二抗)购自中杉北京金桥公司。

1.2 细胞培养及$CD34^+CD38^-$ KG1a细胞白血病干细胞模型的建立

KG1a细胞株购自天津血液病研究所,细胞培养、流式细胞仪分选$CD34^+CD38^-$ KG1a细胞群及AML干细胞模型建立参照文献[6]进行。

1.3 药物敏感性MTT检测

取对数生长期细胞悬液以5×10^3/孔接种于96孔板中,每孔100 μL细胞悬液,设置TPL单药组、IDA单药组、TPL+IDA组和对照组。每个浓度设3个复孔,培养72 h后,加入质量浓度5 μg/mL的MTT工作液20 μL/孔,在37 ℃条件下继续孵育4 h,弃上清液加入150 μL DMSO溶解,室温振荡使沉淀充分溶解,酶标仪上测定570 nm处的光密度值[D(570)]。细胞抑制率=[1-药物组D(570)/对照组D(570)]×100%。

1.4 药物联合作用指数(combined index, CI)的判断方法

CI=DA/[ICX,A]+DB/[ICX,B](A,B代表两种不同药物,[ICX,A]和[ICX,B]是两种药物单独使用使生长抑制率达X时的药物浓度,DA和DB是两药联用使生长抑制率达X时两种药物的浓度)。0.8≤CI<1.0为低度协同作用,0.6≤CI<0.8为中度协同作用,0.4≤CI<0.6为高度协同作用,0.2≤CI<0.4为强协同作用。

1.5 Western blot检测Nrf2蛋白表达水平

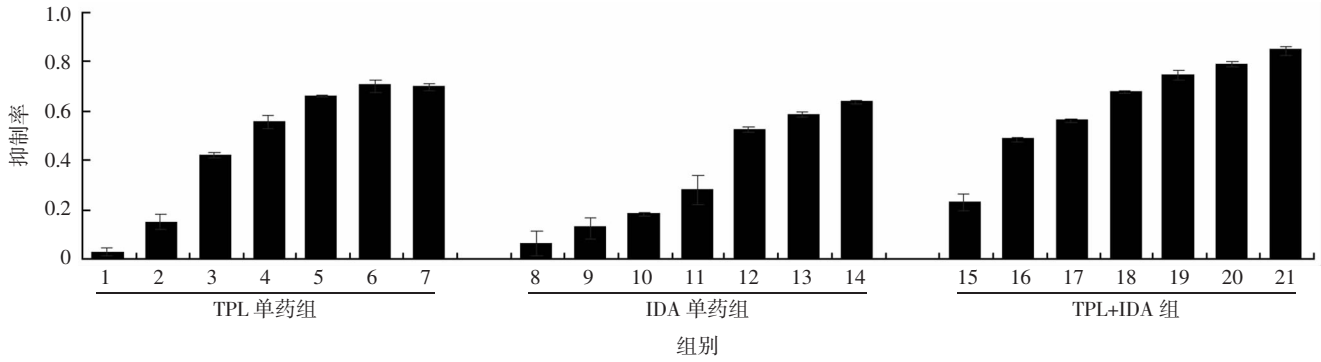
选择IC_{20}浓度的TPL(5 nmol/L)、IC_{50}浓度的IDA(27 nmol/L)单药及上述浓度的TPL联合IDA作用$CD34^+CD38^-$ KG1a细胞后,用RIPA裂解液裂细胞提取上清,按BCA试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白样品用12% SDS-PAGE凝胶进行电泳,电泳完毕后转至PVDF膜上。含5%脱脂奶粉的TBST溶液中37 ℃封闭2 h;加入分别加入1∶1 000稀释Nrf2单抗和内参GAPDH单抗,4 ℃过夜,加入HRP标记的二抗室温作用1 h,膜与化学发光底物反应3 min,暗室中ECL显色,X线片压片曝光。

1.6 实时荧光定量PCR检测各组处理后Nrf2及其下游基因的mRNA表达水平

取分选后对数生长期$CD34^+/CD38^-$细胞分别悬液接种于24孔板,分别用上述各组处理24 h后收集细胞。参照TRIzol的说明书提取细胞总RNA。检测RNA样品浓度及纯度合格后按TaKaRa公司PrimeScript™RT逆转录试剂盒说明书逆转录为cDNA。从GenBank中检索出待测基因的mRNA序列,经Primer Premier 5.0软件分别设计Nrf2、人醌NADH脱氢酶1(NQO1)、谷胱甘肽还原酶(GSR)、血红素氧合酶-1(HO-1)及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游引物和下游引物,并进行BLAST分析(www. ncbi. nlm. nih. gov/BLAST),避免非特异性的扩增,GAPDH为内参基因。PCR引物序列如下:HO-1:上游5′-TTGCCAGTGCCACCAAGTTC-3′,下游5′-TCAGCAGCTCCTGCAACTCC-3′;GSR:上游5′-CCTGATCGCCACAGGTGGTA-3′,下游5′-CTGCCATCTCCACAGCAATGTAA-3′;NQO1:上游5′-GTGGCAGTGGCTCCATGTACTC-3′,下游5′-GAGTGTGCCCAATGCTATATGTCAG-3′;Nrf2:上游5′-ACTCCGGCATTTCACTAAACACAAG-3′,下游5′-CTGAGGCCAAGTAGTGTGTCTCCA-3′。引物由英骏和宝生物公司合成。PCR反应按SYBR试剂盒说明书进行。使用ABI7500荧光定量PCR仪扩增仪进行扩增。$-\Delta Ct=(Ct_{目的基因}-Ct_{GAPDH基因})$,取平均Ct值计算$2^{-\Delta Ct}$值作为标本目的基因mRNA的相对表达量。

1.7 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,两组间均数的比较使用独立样



1~7:TPL 浓度分别为 2.5、5、10、20、30、50、100 nmol/L;8~14,15~21:IDA 浓度分别为 12.5、25、50、100、200、400、800 nmol/L;15~21:TPL 浓度为 5 nmol/L(IC_{20})

图1 不同药物处理组对 AML 干细胞的增殖抑制作用

本 t 检验;多组间均数比较使用单因素方差分析,在方差分析显著的情况下使用 Bonferroni(方差齐性)进行多重比较;若方差不齐则采用近似 F 检验(如 Welch 方法)后采用 Dunnett T3 方法进行多重比较;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准为 $\alpha = 0.05$,双侧检验。

2 结果

2.1 TPL、IDA 单药及 IC_{20}TPL 联合 IDA 对 AML 干细胞的增殖抑制作用

MTT 结果显示 TPL 和 IDA 单药对 AML 干细胞具有一定的增殖抑制作用,72 h 的 IC_{20} 值分别为(4.82±2.14)nmol/L 和(50.31±11.21)nmol/L、IC_{50} 值分别为(20.48±1.60)nmol/L 和(285.20±13.74)nmol/L;而小剂量 TPL(IC_{20} 值,5 nmol/L)与不同浓度 IDA 联合作用于 AML 干细胞后的增殖抑制作用显著高于 IDA 单药,72 h 的 IC_{20} 值可从 IDA 单药的(50.31±11.21)nmol/L 下降到双药联合(1.82±0.23)nmol/L;IC_{50} 值也从 IDA 单药的(285.20±13.74)nmol/L 下降到双药联合的(27.01±0.73)nmol/L,差异均具有统计学意义(IC_{20} 的 $t = 7.494$,$P < 0.01$;IC_{50} 的 $t = 32.51$,$P < 0.01$,图1)。

2.2 药物联合作用指数显示 TPL 与 IDA 双药具有协同作用

TPL 与 IDA 联合作用指数 CI 值在 IC_{20} 时为 0.111,IC_{50} 时为 0.159,在 IC_{75} 时为 0.243,说明两药合用具有强协同作用(图2)。

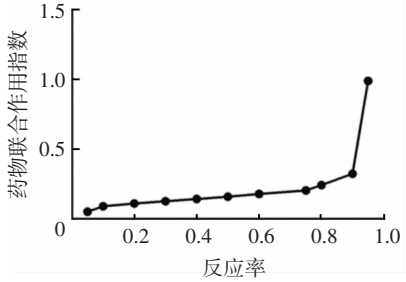
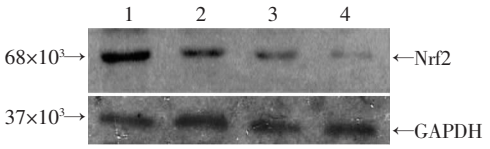


图2 不同药物处理组对 AML 干细胞 CI 指数变化

2.3 Western blot 检测低浓度 TPL 联合 IDA 作用 AML 干细胞后 Nrf2 蛋白的表达水平

IC_{20}浓度的 TPL(5 nmol/L)、27 nmol/L 的 IDA 单药及上述浓度的 TPL 联合 IDA 作用于 AML 干细胞 24 h 后,以 Western blot 检测细胞内 Nrf2 的表达水平,结果显示,IDA 单药组、TPL 单药组及 TPL+IDA 组较之对照组有不同程度地下调,其中 TPL+IDA 组对 Nrf2 表达水平下调最为明显(图3)。



1:对照组;2:IDA 单药组;3:TPL 单药组;4:TPL+IDA 组

图3 Western blot 检测不同药物处理组作用 AML 干细胞 24 h Nrf2 蛋白的表达

2.4 低浓度 TPL 联合 IDA 可降低 AML 干细胞 Nrf2 及其下游基因 mRNA 的表达

实时荧光定量 PCR 检测上述浓度药物处理 AML 干细胞 24 h 后,对照组、IDA 单药组、TPL 单药组及 TPL+IDA 组 Nrf2 及其下游基因 NQO1、GSR 及 HO-1 的表达水平分别为 Nrf2:(1.058±0.083)、(0.842±0.046)、(0.498±0.017)和(0.240±0.024);NQO1:(1.014±0.112)、(0.667±0.046)、(0.495±0.027)和(0.091±0.064);GSR:(1.021±0.059)、(0.648±0.011)、(0.509±0.055)和(0.160±0.021);HO-1(1.007±0.065)、(0.645±0.028)、(0.570±0.020)和(0.137±0.004)。IDA 单药组、TPL 单药组及 TPL+IDA 组 Nrf2 及其下游基因表达水平较之对照组均明显下调($P < 0.01$)。其中 TPL+IDA 组下调最为明显,TPL+IDA 组 Nrf2 及其下游基因 NQO1、GSR 及 HO-1 表达水平均显著低于 TPL 单药组和 IDA 单药组($P < 0.01$)。

3 讨论

目前研究表明,AML 是起源于一小群主要表达 $CD34^+CD38^-$ 的 AML 干细胞,而 AML 干细胞本身数量极少但具有无限自我更新能力和静息特征,并对常规化疗药物不敏感,能导致 AML 的发生、发展。寻找能针对 AML 干细胞生物学特性而将其杀伤的药物可能是最终治愈 AML 的关键[7-8]。目前白血病干细胞的靶向治疗主要包括针对 AML 干细胞特殊的分子调

控途径、表面分子单克隆抗体及微环境等[9]，目前尚无较理想的AML干细胞治疗药物问世。此外，新药开发需要一个漫长过程，文献[10]报道开发一类新抗肿瘤药物一般需要15年的时间，而且需要花费数千万美元，且新药价格昂贵，不适合我国国情。所以从已在临床应用的安全、价廉的药物中开发其具有靶向杀伤AML干细胞的新用途，无疑具有十分重要的意义和广阔的应用前景。

本研究发现TPL和IDA单药需要较高的剂量才能对AML干细胞有一定的杀伤作用，IC_{50}分别为(20.48±1.60)、(285.20±13.74) nmol/L。而对AML干细胞无明显增殖抑制作用的IC_{20}浓度的TPL(5 nmol/L)联合不同浓度IDA处理AML干细胞后，IDA的IC_{50}值从(285.20±13.7) nmol/L降到(27.01±0.73) nmol/L，逆转倍数达10倍以上($P<0.01$)。药物联合作用指数CI值也显示两药合用具有强的协同作用。

活性氧(ROS)是细胞有氧呼吸过程中产生的氧的代谢产物及其衍生的含氧物质的统称，ROS上升引起氧化应激反应在诱导AML干细胞凋亡的作用中越来越引起人们的重视。而Nrf2是体内抗氧化应激反应中起着重要作用的转录因子，它能够拮抗ROS水平的升高，最终保护AML干细胞免受氧化应激的损伤。因此下调Nrf2表达可能是清除AML干细胞的一个潜在靶标[2, 11]。本研究从mRNA及蛋白水平都观察到TPL联合IDA处理后Nrf2表达水平的降低，表明TPL联合IDA可以从mRNA以及蛋白水平显著下调Nrf2基因的表达，从而提高氧化应激反应对AML干细胞的杀伤作用。

Nrf2的下游基因包括了NQO1、GSR、抗氧化酶与HO-1等。NQO1是体内一种重要的二相反应酶，可将NADH或NADPH的电子传递给醌类化合物，生成低毒的氢醌类化合物，避免了对细胞的损伤[12]。GSR是细胞抗氧化酶系统中的1个关键酶，催化氧化型谷胱甘肽还原生成还原型谷胱甘肽，抵抗过氧化作用[13]。HO-1是热休克蛋白家族中的一员，细胞在应对氧化应激时，会适应性的上调HO-1的表达，从而对细胞产生保护作用[14]。研究认为Nrf2的这些下游基因可能形成1个网络，共同保护AML干细胞免受氧化应激损伤[15]。本研究亦观察到Nrf2的下游基因表达水平也在TPL联合IDA作用后显著下降。本研究结果表明，低浓度TPL可能是通过下调Nrf2通路显著增强IDA对AML干细胞的杀伤作用。

本研究发现低浓度TPL能显著增强IDA对AML干细胞的杀伤作用，其机制可能是通过下调Nrf2通路实现。由于TPL和IDA均为临床应用的多年药物，价格相对低廉，具有较广泛的应用前景，下一步应进行体内实验，为将来临床应用奠定更坚实的实验基础。

参考文献：

[1] Ferrara F, Schiffer C A. Acute myeloid leukaemia in adults[J]. Lancet, 2013, 381(9865): 484-495.

[2] Kim T H, Hur E G, Kang S J, *et al*. NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1alpha[J]. Cancer Res, 2011, 71(6): 2260-2275.

[3] Zhu W, Hu H, Qiu P, *et al*. Triptolide induces apoptosis in human anaplastic thyroid carcinoma cells by a p53-independent but NF-kappaB-related mechanism[J]. Oncol Rep, 2009, 22(6): 1397-1401.

[4] Xu B, Guo X, Mathew S, *et al*. Triptolide simultaneously induces reactive oxygen species, inhibits NF-kappaB activity and sensitizes 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines[J]. Cancer Lett, 2010, 291(2): 200-208.

[5] Shi P, Zha J, Guo X, *et al*. Idarubicin is superior to daunorubicin in remission induction of de novo acute myeloid leukemia patients with high MDR1 expression[J]. Pharmacogenomics, 2013, 14(1): 17-23.

[6] 王诗韵，查洁，董慧娟，等. DS/Cu对急性髓系白血病干细胞增殖与凋亡影响及其机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志，2013，20(6)：411-415.

[7] Felipe-Rico J, Hassane D C, Guzman M L. Acute myelogenous leukemia stem cells: from Bench to Bedside[J]. Cancer Lett, 2013, 338(1): 4-9.

[8] Lagadinou E D, Sach A, Callahan K, *et al*. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(3): 329-341.

[9] Norsworthy K, Luznik L, Gojo I. New treatment approaches in acute myeloid leukemia: review of recent clinical studies[J]. Rev Recent Clin Trials, 2012, 7(3): 224-237.

[10] Chong C R, Sullivan D J Jr. New uses for old drugs[J]. Nature, 2007, 448(7154): 645-646.

[11] Ganan-Gomez I, Wei Y, Yang H, *et al*. Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2[J]. Free Radical Bio Med, 2013, 65: 750-764.

[12] Chen F, Liu Y, Wang S, *et al*. Triptolide, a Chinese herbal extract, enhances drug sensitivity of resistant myeloid leukemia cell lines through downregulation of HIF-1α and Nrf2[J]. Pharmacogenomics, 2013, 14(11): 1305-1317.

[13] Cardozo L F, Pedruzzi L M, Stenvinkel P, *et al*. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways *via* activation of the master antioxidant switch Nrf2[J]. Biochimie, 2013, 95(8): 1525-1533.

[14] Li L, Dong H, Song E, *et al*. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling[J]. Chem Biol Interact, 2014, 209: 56-67.

[15] Sporn M B, Liby K T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(8): 564-571.

(**收稿**：2014-03-27；**修回**：2014-04-30)

(编辑 王 红)