基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-0981-04

甲基化抑制剂 5- 氮杂胞苷对 HL-60 细胞增殖及凋亡的影响

苏庸春,徐酉华,蔡 倩,胡艳妮,李 欣,罗 庆
(重庆医科大学附属儿童医院血液肿瘤科,重庆 400014)

【摘 要】目的:观察 5- 氮杂胞苷对髓系白血病细胞系 HL-60 的增殖抑制作用,探讨其对细胞周期、细胞凋亡的影响。方法:常规方法培养 HL-60 细胞,加入不同浓度的 5- 氮杂胞苷,以 MTT 法测定对 HL-60 的抑制作用,计算细胞生长抑制率;流式细胞术检测小剂量 5- 氮杂胞苷处理 HL-60 细胞后 48 h 的细胞凋亡率及细胞周期分布特点。结果:不同浓度 5- 氮杂胞苷均可以不同程度的抑制细胞生长,且表现为时间、浓度依赖性。在小剂量浓度 5- 氮杂胞苷处理 HL-60 细胞 48 h 后,随着 5- 氮杂胞苷浓度的增加,凋亡细胞百分比逐渐增多($P<0.05$);G_1 期细胞逐渐增多,S 期细胞减少,G_2/M 期细胞相对增多,细胞阻滞在 G_1 期。结论:5- 氮杂胞苷对髓系白细胞细胞系 HL-60 的生长抑制表现为浓度和时间依赖性,一定剂量的 5- 氮杂胞苷诱导细胞凋亡,使细胞阻滞在 G_1 期。

【关键词】基因甲基化;5- 氮杂胞苷;白血病;凋亡;细胞周期
【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-10

5-Aza-cytidine inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis

SU Yong-chun, et al
(*Department of Hematology/Oncology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objevtive*: This study was aimed to investigate the effect of 5-aza-cytidine on the proliferation, cell cycles distribution profile and apoptosis of human promyelocytic cell line HL60. *Methods*: The human promyelocytic cell line HL-60 was cultured in RPMI 1640 medium. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylte trazolium (MTT) reduction by cells was used to assess drug-induced cell growth inhibition. Cells were treated with 0.25,

作者介绍:苏庸春(1971-),男,副教授/副主任医师,博士,研究方向:血液肿瘤性疾病临床与基础。
通讯作者:徐酉华,女,教授,E-mail: xuyouhua0504@163.com。
基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(编号:渝卫科教 34 号 06-2-193)。

而导致认知功能的损害。

关于 AngⅣ改善糖尿病大鼠认知功能的机制目前仍不清楚,推测可能与其易化海马的长时程增强(Long-term potentiation,LTP)效应、刺激一氧化氮的合成和分泌,增加中枢血流改善脑灌注、增加海马胆碱乙酰转移酶表达水平,促进乙酰胆碱的合成有关。我们的实验证实,AngⅣ干预组的糖尿病大鼠在认知功能改善的同时,其海马神经元凋亡明显减少,而且 Bcl-xl 表达水平明显上升,因此我们认为,AngⅣ上调海马 Bcl-xl 表达,从而减少海马神经元凋亡,可能是其改善糖尿病大鼠观察认知功能的又一重要途径。

参 考 文 献

[1] Brismar T, Maurex L, Cooray G, et al. Predictors of cognitive impairment in type 1 diabetes[J]. Psychoneuroendocrinology, 2007, 32(8):1041-1051.
[2] Northam E A, Rankins D, Cameron F J. Therapy insight: the impact of type 1 diabetes on brain development and function[J]. Nat Clin Pract Neurol, 2006, 2:78-86.
[3] L. Stefanis, R.E. Burke, L.A. Greene. Apoptosis in neurodegenerative disorders[J]. Curr Opin Neurol, 1997, 10(4):299-305.
[4] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定向图谱[M].北京:人民卫生出版社,1991.12-18.
[5] Tchekalarova J, Kambourova T, Georgiev V. Interaction between angiotensin IV and adenosine A(1) receptor related drugs in passive avoidance conditioning in rats[J]. Behav Brain Res, 2001, 123(1):113-116.
[6] Albiston A L, Pederson E S, Burns P, et al. Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms[J]. Behav Brain Res, 2004, 154(1):239-243.
[7] Olson M L, Olson E A, Qualls J H, et al. Norleucine1-Angiotensin IV alleviates mecamylamine-induced spatial memory deficits[J]. Peptides, 2004, 25(2):233-241.
[8] Wiśniewski K, Borawska M, Car H. The effect of angiotensin Ⅱ and its fragments on post-alcohol impairment of learning and memory[J]. Pol Pharmacol, 1993, 45(1):23-29.
[9] Wright J W, Clemens J A, Panetta J A, et al. Effects of LY231617 and angiotensin Ⅳ on ischemia-induced deficits in circular water maze and passive avoidance performance in rats[J]. Brain Res, 1996, 717(1-2):1-11.
[10] Miller D B, O'Callaghan J P. Aging, stress and the hippocampus[J]. Ageing Res Rev, 2005, 4(2):123-140.

(责任编辑:关蕴良)

0.5,1, 2.5 μmol/L of freshly prepared 5-aza-cytidine for 48 hours before they were harvested for analyzing distribution of cell cycle phases and apoptosis by flow cytometer. *Results*: 5-aza-cytidine inhibited HL60 cell proliferation in a time- and concentration-dependent manner. Apoptosis was induced as detected by flow cytometry. Determination of the cell cycle distribution by flow cytometry revealed an accumulation of cells in G_1 phase. *Conclusion*: DNA methylation inhibitor 5-aza-cytidine has effects on proliferation of human promyelocytic cell line HL60. Possible mechanism of this inhibition is induction of apoptosis.

【Key words】Gene methylation; 5-aza-Cytidine; Leukemia; Cell cycle; Apoptosis

基因甲基化在肿瘤包括白血病的发生、发展中起着重要的作用。在肿瘤细胞中,DNA 的异常甲基化表现为 DNA 广泛的低甲基化和抑癌基因启动子区域 CpG 岛的高甲基化,白血病细胞抑癌基因的高甲基化也得到了广泛的证实。肿瘤相关基因的异常甲基化可以通过临床的治疗来逆转,使其恢复正常状态[1]。因此,抑癌基因的去甲基化成为临床治疗肿瘤的一个新的途径。作为特异性甲基转移酶抑制剂,5- 氮杂胞苷(5-azacitydine,5-Aza)能使甲基化沉默的基因重新表达,恢复其正常功能[2]。在血液肿瘤性疾病的应用方面,5- 杂氮胞苷目前主要应用于骨髓增生异常综合征(Myelodysplastic syndrome,MDS)的治疗。但是该药对髓系白血病细胞的作用及其相关机制尚不清楚,为此,本研究采用 5-aza-C 处理AML 细胞系 HL-60 细胞,观察 5-aza-C 对白血病细胞系的抑制作用及其对 HL-60 细胞凋亡的影响,为髓系白血病的药物选择提供初步实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人 AML 细胞系 HL-60 购自中国科学院上海细胞生物研究所; 小牛血清、RPMI1640 培养基购自 Gibico BRL 公司; 5- 杂氮胞苷、四唑氮蓝(MTT)购自 Sigma 公司;全自动酶标仪为美国的 Bio-Rad Model 550。凋亡检测试剂盒购自上海生工生物科技公司。膜联蛋白 V(Annexin V)试剂盒购自北京宝赛公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和药物处理 HL-60 细胞以 5×10^6 个 /L 的密度接种于含 10% 小牛血清、青霉素(100 U/ml)和链霉素(100 μg/ml)的 RPMI1640 培养液中,于 37℃、5%CO_2 和饱和湿度的培养箱中培养,每 2 d 换液传代。实验采用对数生长期的细胞,用不同浓度(0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100 μmol/L)的 5-aza-Cytidine 分别处理细胞 24、48、72 h,以不加药物组作为对照,收集细胞并洗涤,进行相关检测。

1.2.2 细胞生长的(MTT 法)测定 取对数生长期 HL-60 细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/ml,接种于 96 孔无菌培养板中,每孔 200 μl。根据不同浓度分为 11 组(包括空白对照组),每组为 3 孔(重复 3 次),共接种 3 张板,每天各取出 1 张板进行试验,每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μl,37℃作用 4 h,PBS 洗涤 2 次,加入 150 μl 的 DMSO,振荡器振荡 10 min 以充分融解结晶,置酶联免疫检测仪下 490 nm 波长测吸光度(A)值,打印并记录数据。计算平均吸光度值,按照公式:细胞抑制率 =(1-$A_{实验组}/A_{对照组}$)×100%,计算细胞生长抑制率,并计算半数抑制浓度 IC_{50} 值。最后以抑制率为纵坐标,以药物浓度(μmol/L)为横坐标,绘制生长曲线。

1.2.3 细胞凋亡和细胞周期的检测 取经不同药物浓度处理 48 h 的 HL-60 细胞,对照组不加任何药物,用 PBS(pH 7.2)液洗 2 遍,调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,取 1ml 细胞,400 × g,4℃离心 10 min,弃上清,加入 1 ml 冷 PBS,轻轻振荡使细胞悬浮,重复 2 次,将细胞重悬于 200 μl binding buffer,加入 10 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI,轻轻混匀,避光室温反应 15 min,加入 300 μl binding buffer,1 h 内上流式细胞仪检测。

取经不同药物浓度处理 48 h 的 HL-60 细胞,用 PBS(pH 7.2)液洗 2 遍,调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,加入预冷的 70% 乙醇固定,用于细胞周期检测,测定前用 PBS 洗去乙醇,加入 1 ml PI 染液,37℃避光染色 30 min 后,流式细胞仪上采用 Muticycle DNA Cycle Analysis Software 进行细胞周期分析。细胞周期和凋亡的检测各重复 3 次。

1.3 统计学处理

计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用配对 t 检验,数据处理均用 SPSSl7.0 软件包完成,以 $P\leq0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 5- 氮杂胞苷对 HL-60 细胞的增殖的影响

在实验组细胞的培养液中加入不同浓度的 5- 氮杂胞苷,培养 24、48、72 h 后测 490 nm 的吸光度。结果发现,各浓度 5- 氮杂胞苷均可以不同程度的抑制细胞生长,且表现为时间、浓度依赖性。以 0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 μmol/L 的 5- 氮杂胞苷分别处理 HL-60 细胞 24、48、72 h 后,1.0 μmol/L 及以上浓度的不同时间点检测的抑制率比较均有显著性差异($P<0.05$)。在同一时间点,不同浓度下的抑制率之间有明显差异($P<0.05$),说明随着浓度的增加,5- 氮杂胞苷的增殖抑制效应逐渐增强(图 1)。根据抑制率结果计算出作用 24、48、72 h 的 IC_{50} 为 56.76、5.22、1.78 μmol/L。

2.2 5- 氮杂胞苷对 HL-60 细胞的细胞凋亡的影响

5- 氮杂胞苷使 HL-60 细胞发生凋亡,在小剂量浓度范围内处理 48 h 后,随着 5- 氮杂胞苷浓度的增加,凋亡细胞百

分比逐渐增多，除 0.25 μmol/L 组外，0.5 μmol/L、1 μmol/L、2.5 μmol/L 5- 氮杂胞苷处理 HL-60 细胞后调亡细胞比例较对照组以及四种浓度之间的比较均有显著差异（表 1 及图 2）。

2.3 5-氮杂胞苷对 HL-60 细胞的周期的影响

与空白对照组相比，0.25 μmol/L、0.5 μmol/L、1 μmol/L、2.5 μmol/L 浓度的 5- 氮杂胞苷处理 HL-60 细胞 48 h 后，各浓度组的细胞周期分布与对照组或不同浓度组间的比较均无统计学差异（$P>0.05$），但可见 G_1 期细胞逐渐增多，S 期细胞减少，G_2/M 期细胞相对增多，细胞阻滞在 G_1/S 期，且随着药物浓度的增加，这种阻滞趋势更明显（表 2 及图 3）。

3 讨 论

5- 氮杂胞苷（Azacytidine）是一种胞嘧啶核苷类似物，由 Piskala 等[3]在 1964 年首次合成。5- 氮杂胞苷对真核细胞的作用表现出剂量相关的双重机制，高浓度时具有细胞毒作用，低浓度时通过非竞争性地结合到真核生物 DNA 上甲基转移酶的结合位点，并阻断甲基转移酶的活性而发挥脱甲基作用[4]。1971 年美国国立癌症研究院首先证明 5- 氮杂胞苷具有抗肿瘤活性[5]。1991 年证实小剂量 5- 氮杂胞苷对 MDS 患者有效[6]。此后临床研究显示，5- 氮杂胞苷对 MDS 的完全缓解率为 10%，部分缓解率为 1%，血液学进步 36%，总有效率为 48%[5]，因而使 5- 氮杂胞苷成为目前 FDA 核准的第一个利用 DNA 去甲基化作用治疗 MDS 的抗肿瘤注射药物[7]。此外，5- 氮杂胞苷可能通过诱导 caspase-8 表达，激活 caspase 依赖途径，使阿霉素诱导神经母细胞瘤细胞凋亡的作用放大，从而可以提高阿霉素对神经母细胞瘤细胞的敏感性[8]。有报道 5- 氮杂胞苷在复发性和顽固性急性白血病和慢性髓性白血病危象时具有明显疗效[9]。本研究也证实，不同浓度的 5- 氮杂胞苷对髓系白血病细胞系具有增殖抑制活性，作用 24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为 56.76、5.22、1.78 μmol/L，并且存在一定的量效、时效关系，提示 5- 氮杂胞苷有广谱抗瘤作用。

表 1 不同浓度的 5- 氮杂胞苷处理 HL-60 细胞后的凋亡细胞比例

不同浓度 5- 氮杂胞苷处理组	细胞凋亡比例	P 值（与对照组比较）
对照组	8.94 ± 2.81	
0.25 μmol/L	9.58 ± 4.59	0.263
0.5 μmol/L	20.84 ± 8.47	0.031
1 μmol/L	30.37 ± 12.04	0.018
2.5 μmol/L	51.15 ± 22.64	0.013

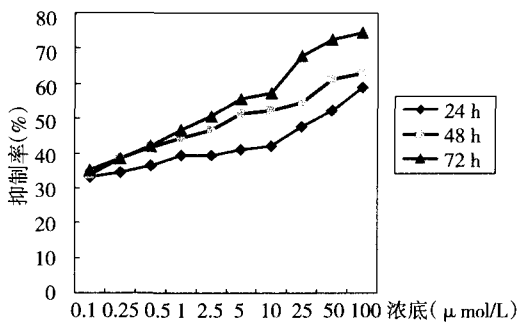
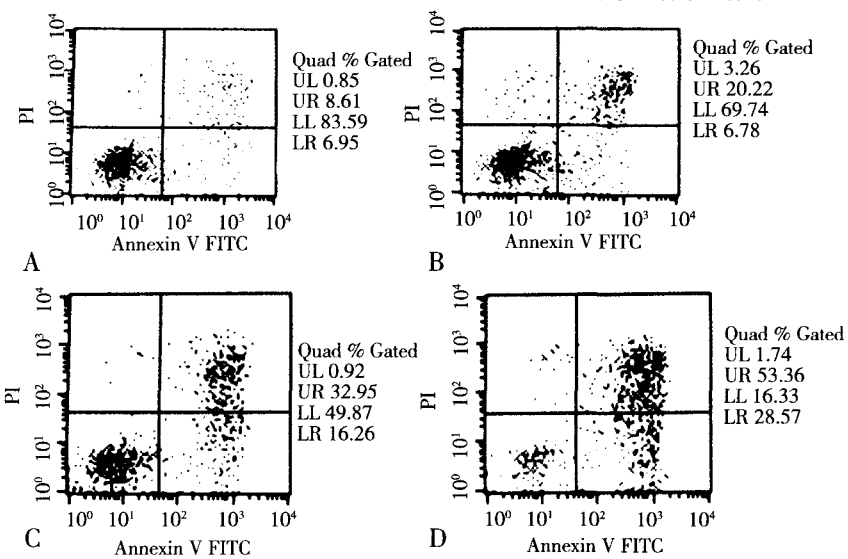


图 1 不同浓度的 5- 氮杂胞苷对 HL-60 的抑制效应

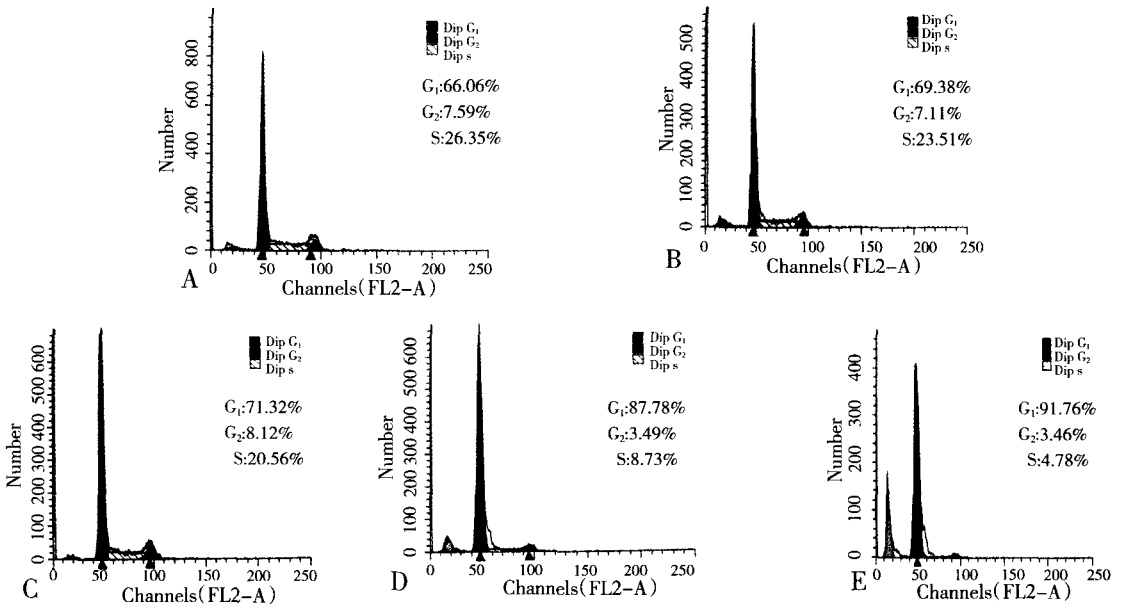


1 次结果：A. 0.25 μmol/L 处理组；B. 0.5 μmol/L 处理组；C.1 μmol/L 处理组；D.2.5 μmol/L 处理组）

图 2 不同浓度的 5- 氮杂胞苷处理 HL-60 细胞 48 h 后的凋亡情况

表 2 不同浓度的 5- 氮杂胞苷处理 HL-60 细胞后细胞周期分布

细胞周期分布	对照	浓度 0.25（μmol/L）	浓度 0.5（μmol/L）	浓度 1（μmol/L）	浓度 2.5（μmol/L）
G_1 期	64.62 ± 11.47	56.09 ± 16.52	60.69 ± 16.16	68.54 ± 18.61	72.84 ± 21.83
G_2/M 期	8.11 ± 0.65	8.53 ± 2.85	8.58 ± 3.70	10.06 ± 5.25	10.47 ± 2.79
S 期	25.70 ± 11.72	27.53 ± 12.78	25.91 ± 11.66	18.57 ± 13.16	10.53 ± 1.45



(A. 未处理组;B. 0.25 μmol/L 处理组; C. 0.5 μmol/L 处理组; D. 1 μmol/L 处理组;E. 2.5 μmol/L 处理组)

图 3 不同浓度的 5- 氮杂胞苷处理 HL-60 细胞 48 h 后的细胞周期检测

体外实验表明,5- 氮杂胞苷是一种浓度依赖性细胞毒药物,2 ~ 8 μmol/L 时干扰 RNA 代谢,16 μmol/L 以上既干扰 RNA 代谢又抑制 DNA 的复制,用 2 ~ 6 μmol/L 作用 8 h,白血病细胞集落减少 4% ~ 69%,大量的细胞被阻止于 G_1 期,当 5- 氮杂胞苷浓度为 160 μmol/L 作用 12 h,白血病细胞集落减少 >95%[10]。本研究通过流式细胞术检测发现 HL-60 细胞在 5- 氮杂胞苷处理 48 h 后,大多数细胞被阻滞于 G_1 期,与前述报道一致。

由于表观遗传学异常在肿瘤的发生发展中的作用受到了广泛的证实,基因甲基化是表观遗传异常的主要表现,推测 5- 氮杂胞苷作用于肿瘤细胞的主要机制可能是 5- 氮杂胞苷重新激活那些由于 DNA 过度甲基化而失活的基因,从而使细胞向终末分化、凋亡或衰老。也有研究表明 5- 氮杂胞苷能干扰核酸代谢而直接对异常增生的造血干细胞产生细胞毒性作用,此活性直接影响细胞周期的 DNA 合成期(S phase)[11]。本研究在对 5- 氮杂胞苷作用后的 HL-60 细胞凋亡检测后发现,经过药物处理后凋亡细胞比例较对照组显著增加,提示 5- 氮杂胞苷的抗肿瘤活性主要通过诱导细胞凋亡途径实现。

总之,5- 氮杂胞苷作为一种基因甲基化抑制剂,对人类急性早幼粒细胞系 HL-60 细胞的作用是多方面的,诸如可抑制细胞增殖、诱导细胞周期阻滞及凋亡。表观遗传学异常是肿瘤性疾病发生的重要原因之一,随着基因甲基化抑制剂对肿瘤细胞作用机制的深入研究,将进一步扩大 5- 氮杂胞苷这类药物在肿瘤临床治疗上的应用。

参 考 文 献

[1] Michael T M, Johann C B, and Paula M V. Cancer DNA methylation: Molecular mechanisms and clinical implications[J].Clin.Cancer Res, 2009,15(12): 3927-3937.

[2] Issa J-P J.DNA methylation as a therapeutic target in cancer[J].Clinical Cancer Research,2007,13(6):1634-1637.

[3] Piskala A,Sorm F. 5-Azacytidine,a new highly effective cancer ostatic[J].Experientia,1964,20(4):202-203.

[4] Glover A B,Leyland J B.Biochemistry of azacytidine:a review[J]. *Cancer Treat Rep*,1987,71(10):959-964.

[5] Kaminskas E,Farrell A,Abraham S,et al.Approval summary:Azacytidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes[J].Clin Cancer Res,2005,11(10):3604-3608.

[6] Chitambar C R,Libnoch J A,Matthaeus W G,et al.Evaluation of continuous infusion low dose 5-azacytidine in the treatment of myelodysplastic syndromes[J].Am J Hematol,1991,37(2):100-104.

[7] Kaminskas E.FDA drug approval summary:azacytidine (5-azacytidine,vidaza(tm))for injectable suspension[J].Oncologist,2005,10(3): 176-182.

[8] 刘建秋,李爱敏,张继红.5- 氮杂胞苷增强阿霉素对神经母细胞瘤细胞的抗瘤活性[J].中国当代儿科杂志,2007,9(6):577-579.

[9] Kang D W,Choi C H,Park J Y,et al.Ciglitazone induces caspase independent apoptosis through down regulation of xiap and survivin in human glioma cells[J]. Neurochem Res,2008,33(3):551-561.

[10] Murakami T,Li X,Gong J,et al.Induction of apoptosis by 5 azacytidine:drug concentration-dependent differences in cell cycle specificity[J]. Cancer Res,1995,55(14):3093-3098.

[11] Zinzar S,Silverman L R,Richardson E B,et al.Azacytidine plus verapamil induces the differentiation of a newly characterized biophenotypic human myeloid B lymphoid leukemia cell line BW-90[J].Leuk Res, 1998,22(8):677-685.

(责任编辑:冉明会)