维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0673-05

DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体对 HL60 细胞的杀伤作用研究

张 颖,娄世峰

(重庆医科大学附属第二医院血液科,重庆 400010)

【摘 要】目的:制备 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体并观察其对白血病细胞株 HL60 的杀伤作用,为探索临床治疗急性髓性白血病(Acute myelogenous leukemia,AML)的新方法提供实验依据。方法:用逆向蒸发法制备 DHAQ 脂质体、戊二醛交联法偶联 GM-CSF 和 DHAQ 脂质体制备 GM-CSF 免疫脂质体,MTT 法测定其对白血病 HL60 细胞的杀伤作用,透射电镜观察凋亡细胞形态,流式细胞术测定凋亡率。结果:DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体对 HL60 的细胞毒作用显著强于 DHAQ 脂质体和 DHAQ,免疫脂质体作用后细胞超微结构破坏,形成大量凋亡小体。结论:成功制备并鉴定了 GM-CSF-DHAQ 免疫脂质体,其对 HL60 细胞具有靶向性杀伤作用,为进一步研究奠定了基础。

【关键词】免疫脂质体;免疫导向治疗;白血病;HL60 细胞

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-20

Effect of DHAQ-GM-CSF immunoliposomes on HL60 cells

ZHANG Ying,et al

(*Department of Hematology,the Second Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To prepare DHAQ-GM-CSF immunoliposomes and observe the cytotoxicity of HL60 cells treated with the immunoliposomes for providing the preclinical data for AML therapy. *Methods*:DHAQ liposomes were prepared by reverse-phase evaporation(REV),and GM-CSF was coupled to the DHAQ liposomes.The cytotoxicity of HL60 cells treated with the immunoliposomes was measured by tetrazolium microculture(MTT) celluar cytotoxicity test.The data of cellar untrastructure and apoptotic rate were collected by transmission electron microscopy,and flow cytometric analysis. *Results*:DHAQ-GM-CSF immunoliposomes had better effects on the cytotoxicity of HL60 cells than DHAQ liposomes and DHAQ.The cellar untrastructure was markly destroyed and many apoptotic bodies formed after the treatment. *Conclusion*:DHAQ-GM-CSF immunoliposomes are successfully prepared and verified,which have targeting cytotoxicity on HL60 cells.The study establishes the foundation for futher investigation.

【Key words】Immunoliposomes;Targeted immunological therapy;Leukemia;HL60 cells

GM-CSF 是粒单系祖细胞增殖分化的正向调节因子,研究发现大多数 AML 细胞和白血病细胞株 HL60、KG-1 都表达 GM-CSF 受体[1],故 GM-CSF 可作为免疫导向物质在 AML 的靶向治疗方面发挥作用[2,3]。我们以 GM-CSF 作为免疫导向物质,以脂质体为载体,制备包封有抗白血病药物米托蒽醌(DHAQ)的免疫脂质体,采用体外模型,探讨其对 AML 细胞株 HL60 的细胞毒作用和对凋亡的影响,与普通 DHAQ 脂质体和 DHAQ 进行比较。

1 材料和方法

作者介绍:张 颖(1977-),女,住院医师,硕士,研究方向:血液系统恶性肿瘤的治疗。

通讯作者:娄世锋,男,教授,E-mail:loushifeng@hotmail.com。

1.1 材料

1.1.1 细胞 HL60 细胞系由上海生物研究所提供。

1.1.2 主要试剂和原料 DHAQ 原料药购自重庆凯林制药有限公司;GM-CSF 原料药由北京北医联合医药有限公司提供,其结合位点平均为 322 个/HL60 细胞[1];胆固醇、卵磷脂、MTT、DMSO 购自 Sigma 公司;PE-抗人 GM-CSF 抗体及对照购自美国 Biolegend 公司;FTIC-Annexin-Ⅴ购自北京晶美生物技术有限公司;胎牛血清购自杭州四季青工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体的制备、纯化和鉴定 采用逆向蒸发法制备 DHAQ 脂质体[4]:取 10mg DHAQ 原料药,溶于 20ml 蒸馏水中备用,另取卵磷脂(Pc) 2g、胆固醇(Cho) 0.4g(Pc∶Cho=1∶0.2,W/W),加入 60ml 乙醚,搅拌至完全溶解,将 DHAQ 溶液缓慢加入 Pc 和 Cho 的乙醚溶液中(WPc∶

维普资讯 http://www.cqvip.com

WDHAQ=200∶1,有机相∶水相=3∶1),边加边搅拌,再置于超声振荡仪中振荡约 30min,见水相和有机相混合均匀,呈蓝色乳状悬液。乳状液以旋转蒸发仪减压蒸发 40min,30℃,中间加入 PBS 缓冲液 15ml。上述操作均在 20℃室温下进行。

采用离心法分离脂质体和游离 DHAQ 水溶液:将制得的乳状液以 10 000r/min 的转速离心 20min,取脂质体层用于免疫脂质体的制备,水溶液层用于包封率的测定。

包封率的计算:$Q_W\%=[(W_{总}-W_{游})/W_{总}]\times 100\%$($Q_W\%$为包封率;$W_{总}$为 DHAQ 的总投样量;$W_{游}$为未包封的游离 DHAQ 含量)。

其中 $W_{游}$的测定参照中国药典第二部中 DHAQ 和注射用 DHAQ 的含量测定项下的规定,采用比色法进行测定[5]。

采用戊二醛交联法制备免疫脂质体[6]:取 10%的 DHAQ 脂质体溶液 13ml,加入 25%的戊二醛 13ml,室温 20℃,放置 10min,过量的戊二醛用生理盐水透析 4h 除去,中间换液 2 次,加入 1mgGM-CSF 原料药,4℃过夜。

采用蔗糖密度梯度离心法分离游离 GM-CSF 和免疫脂质体[7]:取 2.4 中制得的 DHAQ—GM-CSF 免疫脂质体 0.4ml,加入 0.8ml 蔗糖溶液(30%,W/W)混匀,放入离心管中,轻轻加入 2.4ml 蔗糖溶液(15%,W/W)作为第二层,最上层加 0.4ml 缓冲液作为封闭层,4℃,30 000r/min,离心 30min,从上到下吸出,封闭层和脂质体层各 0.4ml,脂质体层再按上述方法梯度离心 1 次。

采用紫外分光光度法测定偶联率[9]:取纯化后的 DHAQ—GM-CSF 免疫脂质体加入比色杯中,在 280nm 波长处测定其 A 值,连续测定 3 个样本,计算平均值,再代入公式计算:

偶联率=(纯化后 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体的 A 值/纯化前 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体的 A 值)×100%

采用流式细胞术测定免疫脂质体中 GM—CSF 活性的保留率:取对数生长期的 HL60 细胞,调成密度为 5×10^8 个/L 的细胞悬液,接种于 6 孔板上,每孔加入细胞悬液 3ml,实验分为 3 组:DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体组、GM-CSF 组和空白对照组,DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体组加入浓度为 2.5μg/ml 的免疫脂质体溶液 300μl,GM-CSF 组加入浓度为 0.9μg/ml 的 GM-CSF 溶液 300μl,空白对照组加入等体积生理盐水。于 CO_2 孵箱内培养 2h 后,2 000r/min 离心 10min,弃培养液,用 PBS 洗涤 2 次,2 000r/min 离心 20min,弃上清液,收集细胞,加入 PE-抗人 GM-CSF 抗体,0.5h 后用 PBS 洗涤 2 次,流式细胞仪分析。

1.2.2 细胞毒实验 采用 MTT 法:取无药培养 1 周的 HL60 细胞,配成 5×10^4/ml 的悬液接种于 96 孔板中,每孔 200μl(1×10^4 个细胞/孔)。实验分为 4 组:DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体组、DHAQ 脂质体组、DHAQ 组、空白对照组。前 3 组依次加入浓度(按 DHAQ 的含量计)为 0.002 5μg/ml、0.025μg/ml、0.25μg/ml、2.5μg/ml、25μg/ml 的相应处理溶液,20μl/孔,第4 组加入等体积的生理盐水。每个浓度组设 3 个平行孔。将 96 孔板置于振荡器上振荡 20min 后置于 CO_2 孵箱内培养 24h、48h 后,吸去培养液,加入无血清的培养液 200μl/孔和浓度为 50mg/ml 的 MTT 溶液 20μl/孔,轻轻振荡培养板,放回 CO_2 孵箱中孵育 4h,吸尽每孔中的液体,加入二甲基亚砜 150μl/孔,于振荡器上振荡 20min,使形成的紫色结晶充分溶解,用酶标仪测定每孔的 A 值(波长为 490nm)。实验重复 3 次,取每组每一浓度的均值求细胞存活率:细胞存活率=(处理组 A_{490}nm 值/对照组 A_{490}nm 值)×100%。细胞抑制率=1-细胞存活率。根据线性方程求得 IC_{50}。

1.2.3 验证实验 采用 MTT 法与细胞毒实验同时进行。实验分 5 组:每组首先加入 7.5ng 饱和量的 GM-CSF(含 3×10^{11} 个 GM-CSF 分子,是每孔细胞结合位点的 10^4 倍),置于 CO_2 孵箱中孵育 1h,然后加入浓度依次为 0.002 5μg/ml、0.025μg/ml、0.25μg/ml、2.5μg/ml、25μg/ml 的 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体溶液 20μl/孔,每个浓度设置 3 个平行孔,以 MTT 法求细胞存活率,再与细胞毒实验中 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体组和 DHAQ 脂质体组的结果作对比。

1.2.4 透射电镜观察 DHAQ 脂质体解构和粒径分布:将 DHAQ 脂质体原液稀释 80 倍,滴在有膜铜网上,阴干,滴加 1%醋酸双氧铀溶液,静置 5min,滤纸吸干,H600 透射电镜下放大 6 万倍观察其形态并摄影。细胞形态:取对数生长期的 HL60 细胞,调成密度为 5×10^8 个/L,接种于 6 孔板上,每孔 3ml。实验分 2 组:DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体组和空白对照组,DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体组加入浓度为 2.5μg/ml 的免疫脂质体溶液 300μl,空白对照组加入等体积生理盐水。于 CO_2 孵箱中培养 24h,2 000r/min 离心 10min,弃培养液,用 PBS 洗涤 2 次,2 000r/min 离心 20min,弃上清液,4℃预冷的 3.5%戊二醛沿管壁缓慢加入,覆盖沉淀的细胞,固定 1h,用探针拨离细胞团块,凝胶包埋,锇酸染色,超薄切片,H600 透射电镜下观察细胞超微结构的改变及凋亡细胞形态特征。

1.2.5 流式细胞术检测早期凋亡情况 Annexin V/PI 双染法,实验分 4 组:DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体组、DHAQ 脂质体组、DHAQ 组、空白对照组,细胞处理方法同验证实验,培养 6h 后弃培养液,收集细胞,孵育缓冲液洗 1 次,用 100μl 的 Annexin V 标记液重悬细胞,室温下孵育 10～15min,沉淀细胞,孵育缓冲液洗 1 次,加入荧光(SA-Flous)溶液,4℃下孵育 20min,离心去上清,孵育缓冲液洗涤 1 次,加入 400μl 孵育缓冲液洗,流式细胞仪分析。

2 结 果

2.1 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体的鉴定结果

包封率:81%;多为单层脂质体,粒径:170～220nm(见图 1);偶联率:41.7%;活性保留率 75.1%。

2.2 MTT 实验及验证实验结果

经 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体、DHAQ 脂质体、DHAQ 处理 24h、48h 后,HL60 细胞存活率见表 1、2。DHAQ—GM-CSF 免疫脂质体、DHAQ 脂质体

维普资讯 http://www.cqvip.com

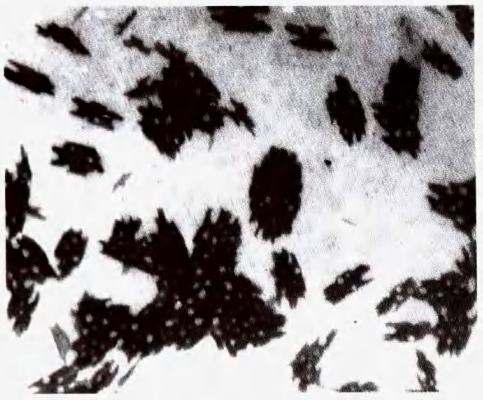


图1 电镜下的脂质体 ×60 000

和 DHAQ 对 HL60 细胞作用 24h 的 IC_{50} 分别是：9.33 μg/ml、3.04 μg/ml、18.15 μg/ml；作用 48h 的 IC_{50} 分别是：3.02 μg/ml、0.87 μg/ml、6.69 μg/ml（见图 2、3）。预先加入饱和量的 GM-CSF 可阻断 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体对 HL60 细胞的毒性作用，24h 和 48h 时各浓度组的阻断实验组的细胞存活率均显著高于相应浓度的 DHAQ—GM-CSF 组（$P<0.05$）。

2.3 透射电镜观察结果

DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体作用 24h 后的 HL60 细胞，经瑞特染色，在光镜下可见细胞胞浆浓缩，染色质变粗、核浓缩、核碎裂等细胞凋亡的形态。透射电镜下可见大量坏死细胞和凋亡细胞，凋亡细胞膜和线粒体结构完整，染色质浓缩，沿核膜聚集成块状和新月状，形成大量凋亡小体（见图 4）。

2.4 流式细胞数检测早期凋亡结果

经 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体、DHAQ 脂质体、DHAQ 作用 6h 后的 HL60 细胞中可出现凋亡细胞，DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体组的凋亡率（25.05%）较 DHAQ 脂质体组（15.33%）和 DHAQ 组（6.64%）显著提高（$P<0.05$）。

3 讨 论

脂质体研究是一个十分活跃的领域，最早是指天然脂类化合物悬浮于水中形成的具有双层封闭结构的包囊，现在也可以由人工合成的磷脂化合物来制备。脂质体的研究主要集中在 3 个领域：模拟膜的研究，药品的可控释放和在体内的靶向给药，在体外培养中将基因和其他物质向细胞内的传递。近年来，随着生物技术的不断发展，脂质体制备工

表 1 不同浓度的 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体、DHAQ 脂质体、DHAQ 作用 24h 对 HL60 细胞的杀伤作用（$\bar{x}\pm s$）

浓度（μg/ml）（以 DHAQ 计）	HL60 存活率（SR，%）			
	DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体	DHAQ 脂质体	DHAQ	阻断实验
0.002 5	98.6 ± 0.5	98.3 ± 0.8	99.4 ± 0.5	100.8 ± 0.8#
0.025	80.8 ± 0.5*	99.2 ± 0.8#	99.7 ± 0.5#	99.6 ± 0.6#
0.25	70.6 ± 1.0*	74.9 ± 0.5*#	84.9 ± 0.6#	95.2 ± 0.5#
2.5	54.5 ± 1.8*	60.1 ± 0.9*#	78.0 ± 1.7#	89.8 ± 0.9#
25	13.8 ± 1.8*	24.3 ± 0.5*#	46.0 ± 2.6#	82.8 ± 1.8#

注：以 SAS 软件包进行两样本均数间的 q 检验，$\alpha=0.05$；* 与相应浓度的 DHAQ 组比较，$P<0.05$；# 与相应浓度的 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体组比较，$P<0.05$。

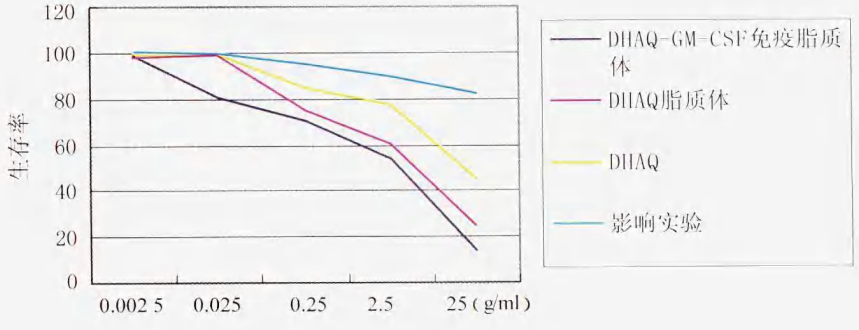


图 2 不同浓度的 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体、DHAQ 脂质体、DHAQ 作用 24h 对 HL60 细胞的杀伤作用图

维普资讯 http://www.cqvip.com

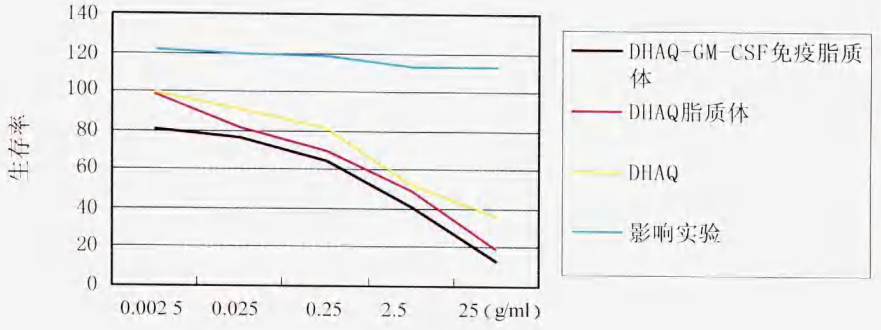


图 3 不同浓度的 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体、DHAQ 脂质体、DHAQ 作用 48h 对 HL60 细胞的杀伤作用图

表 2 不同浓度的 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体、DHAQ 脂质体、DHAQ 作用 48h 对 HL60 细胞的杀伤作用($x \pm s$)

浓度(μg/ml)(以 DHAQ 计)	HL60 存活率(SR,%)			
	DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体	DHAQ 脂质体	DHAQ	阻断实验
0.002 5	80.3 ± 0.8*	98.9 ± 0.5*#	100 ± 0.0#	121.4 ± 2.7#
0.025	76.6 ± 1.2*	82.3 ± 2.0*#	91.2 ± 4.8#	119.2 ± 4.2#
0.25	64.3 ± 0.9*	70.0 ± 1.2*#	82.3 ± 1.2#	119.0 ± 7.6#
2.5	41.4 ± 1.9*	49.1 ± 1.1*#	53.1 ± 1.7#	113.4 ± 2.1#
25	13.4 ± 1.9*	19.4 ± 1.9*#	36.2 ± 3.8#	112.6 ± 4.0#

注：以 SAS 软件包进行两样本均数间的 q 检验，α=0.05。* 与相应浓度的 DHAQ 组比较，$P<0.05$；# 与相应浓度的 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体组比较，$P<0.05$。

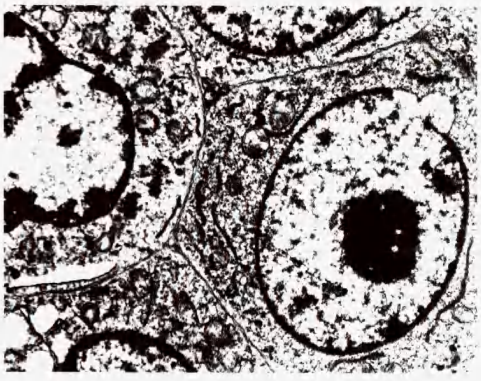


图 4 电镜下的 HL60 细胞

艺的逐步完善，脂质体作用机制进一步阐明，加之脂质体具有适合体内降解、无毒性和免疫原性、作为药物载体可以提高药物的治疗指数、降低药物毒副作用和减少药物剂量等优点，脂质体作为药物载体的研究愈来愈受到重视。脂质体是一种定向药物载体，它具有类细胞结构，进入人体内主要被网状内皮系统吞噬而激活肌体自身的免疫功能，并改变被包封药物的体内分布，使药物主要在肝、脾、肺和骨髓等组织器官中蓄积，从而提高药物的治疗指数、减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性。因此，脂质体在许多疾病尤其是癌症的治疗中显示了明显的优越性。但脂质体本身的靶向性是一种非特异性作用，要使脂质体特异性地分布到特定的组织器官需要在脂质体表面联接上免疫导向物质制成免疫脂质体。

免疫脂质体的优点是载药量大，体内滞留时间长，又有专一靶向性，是当前较受重视的一种释药系统[9]。在免疫导向物质的选择方面目前国内外最常用的是单克隆抗体，但单抗价格昂贵、且在人体内鼠型单抗致人抗鼠抗体(HAMA)产生，不能多次重复使用[10]，临床应用受到限制，故我们选择 GM-CSF 作为免疫导向物质[11]。GM-CSF 是粒单核细胞系祖细胞增殖分化的正向调节因子，它能刺激髓系造血细胞生长和分化，增强成熟粒细胞和单核巨噬细胞的功能。GM-CSF 通过结合细胞表面的同源受体发挥作用。Linda S. Park 等用 ^{125}I 标记的 GM-CSF 来研究体外细胞系和来自 AML 和急性淋巴细胞性白血病(Acute lymphcytic leukemia，ALL)患者细胞上相应受体的分布时发现研究的所有

维普资讯 http://www.cqvip.com

AML 患者的白血病细胞和体外细胞株 HL60,KG-1 都表达 GM-CSF 受体。此外,近年来国内国外的文献多次发表了用 GM-CSF 结合免疫毒素在治疗难治性和复发性的 AML 方面的研究报导,可见 GM-CSF 作为载体用于免疫导向治疗是完全可行的。它的优势在于重组人 GM-CSF 易得到,不会刺激体内产生抗体而影响疗效,可多次重复使用。由于部分白血病细胞高表达 GM-CSF 受体,故用 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体治疗 AML 可能还有相对选择作用,其疗效可能优于用单抗介导的免疫导向治疗。

本研究中采用 MTT 实验考察各种药物对 HL60 细胞增殖的抑制作用。通过实验发现:DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体对 HL60 细胞具有显著的增殖抑制效应。当药物浓度≥0.025 μg/ml 时,DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体和 DHAQ 脂质体对 HL60 细胞的杀伤作用与 DHAQ 相比均具有显著性差异,而且 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体和 DHAQ 脂质体相比前者的杀伤作用也显著强于后者。说明制成免疫脂质体制剂可能提高 DHAQ 的疗效,同时降低毒副作用,使 DHAQ 发挥更佳的抗 AML 作用。而且,由于较低剂量的免疫脂质体即可发挥强大的杀伤作用,故我们推测 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体还具有克服耐药的作用,但此结论还需进一步的实验结果支持。

通过本研究我们发现 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体具有体外抗白血病作用,为进一步研究打下重要基础。

参 考 文 献

[1] Linda SP,Peter EW,Della F,et al. Interleukin-3,GM-CSF,and G-CSF receptor expression on cell lines and primary leukemia cells:receptor heterogeneity and relationship to growth factor responsiveness[J]. Blood,1989;74(1):56-65.

[2] Frankel AE,Powell BL,Hall PD,et al. Phase Ⅰ trail of a novel diphtheria toxin/granulocyte macrophage colony-stimulating factor fusion protein (DT388GMCSF) for refractory or relapsed acete myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res,2002;8(5):1004-1013.

[3] Burbage C,Tagge EP,Harris B,et al. Fusion toxin targeted to the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor is selectively toxic to acute myeloid leukemia cell[J]. Leuk-Res,1997;21(7):681-690.

[4] Szoke F. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1978;75(9):4194.

[5] 郑筱萸.《中华人民共和国药典》附录Ⅳ B 比色法[Z]. 北京:国家药典委员会,2000.

[6] 汪 冰, 杨翰仪. 单克隆抗体偶联质质体的制备及其及其与胃癌细胞特意结合研究[J]. 沈阳药学院学报,1993;11(1):17.

[7] 汪 冰, 杨翰仪. 用密度梯度离心法分离脂质体-Ig 复合物和游离 Ig[J]. 中华物理医学杂志,1993;1(15):39.

[8] 牛荣丽,薛 弘,李志良.阿苯达唑免疫脂质体的制备[J]. 新疆医科大学学报,2001;24(1):60-62.

[9] Bendas G. Immunoliposomes:a promising approach to targeting cancer therapy[J]. BioDrugs,2001;15(4):215-224.

[10] Jurcic JG,Caron PC,Miller WH J,et al. Seqpuential targeted therapy for relapsed acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anti-CD33 monoclinal antibody M195[J]. Leukemia, 1999;9:244.

[11] 陈 姝,娄世锋,张 颖.GM-CSF 耦联米托蒽醌脂质体的制备及体外抑瘤作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2007;29(10):925-928.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 664 页)

angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells[J]. Life Sci,1999;64(4):249-258.

[7] Pawlak K,Pawlak D,Myliwiec M. Possible association between circulating vascular endothelial growth factor and oxidative stress markers in hemodialysis patients[J]. Med Sci Monit,2006;12(4):181-185.

[8] Pawlak K,Pawlak D,Mysliwiec M,et al. Impaired renal function and duration of dialysis therapy are associated with oxidative stress and proatherogenic cytokine levels in patients with end-stage renal disease[J]. Clin Biochem,2007;40(1-2):81-85.

[9] 冯利平,张 玲,钟 玲,等,VitE 对维持性血液透析患者氧化应激状态的影响[J]. 重庆医科大学学报,2007;32(2):160-162.

[10] Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS[J]. Antioxid Redox Signal,2007;9(6):731-739.

[11] Ikeda S,Ushio-Fukai M,Zuo L,et al. Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis [J]. Circ Res,2005;96(4):467-475.

(责任编辑:关蕴良)