维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0318－04

阿司匹林诱导 HL－60 细胞凋亡的实验研究

罗 云[1], 唐宗山[2], 黄宗干[2]

(1.重庆医科大学第二临床学院血液科,重庆 400010;2.重庆医科大学临床学院血液科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究非甾体类抗炎药阿司匹林(ASA)对体外诱导人急性白血病细胞的凋亡作用及其相关机制。方法:采用 MTT 法测定 ASA 对 HL－60 细胞的抑制率,通过光镜、流式细胞仪(FCM)、原位末端标记法(TUNEL)观测 ASA 诱导 HL－60 细胞凋亡,半定量 RT－PCR 检测基因表达。结果:浓度为 2.5～10mmol/L 的 ASA 能抑制 HL－60 细胞增殖,诱导细胞凋亡;ASA 与阿糖胞苷(Ara－c)抗肿瘤作用具有相加效应;ASA 可下调 HL－60 细胞 c－myc mRNA 水平表达。结论:一定浓度 ASA 在体外有抑制急性白血病细胞生长和诱导细胞凋亡的作用,其机制可能与 c－myc 基因下调有关。

【关键词】阿司匹林;细胞凋亡;HL60

【中国图书分类法分类号】Q952.1;R971⁺.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－10－27

Aspirin induces apoptosis on human myeloid leukemia cell line HL－60

LUO Yun, et al

(*Department of Hematology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of aspirin(ASA) on the apoptosis of human myeloid leukemia cell in vitro and its mechanisms. *Methods*: Inhibition rate was tested by MTT method. Apoptosis induced by ASA in HL－60 cells was investigated by applying light microscopy, TdT－mediated dUTP Nick－end Labeling(TUNEL) and flow cytometry analysis techniques. RT－PCR method were used to examine mRNA expression. *Results*: 2.5～10.0mmol/L ASA can induce apoptosis and inhibit proliferation in HL－60 cells, and increase the sensitivity of HL－60 cells to Ara－c. ASA down－regulated the level of c－myc mRNA. *Conclusion*: A certain dosage of ASA can suppress the proliferation and induce apoptosis of acute leukemia cells in a dose dependent manner. One of the mechanisms of ASA inducing apoptosis may be related to down－regulated expression of c－myc mRNA.

【Key words】*Aspirin*; *Apoptosis*; *HL－60*

非甾体类抗炎药(NSAIDs)是一大类临床常用药物,近年来有证据显示 NSAIDs 具有较广谱的抗肿瘤作用,尤其是在肠道肿瘤[1]。阿司匹林被证实能增强维生素 D_3,维甲酸对白血病细胞系的分化作用[2],且其代谢产物水杨酸钠能诱导多种白血病细胞系发生凋亡[3];但阿司匹林直接对急性白血病细胞作用尚未见报道。本研究以人急性髓细胞性白血病细胞系 HL－60 为细胞模型,研究阿司匹林对其生长影响,并选用多种指标检测凋亡,进一步探讨相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

阿司匹林(Aspirin)西南药业股份公司,RPMI－1640 细胞培养基 Gibco 公司,MTT(四甲基偶氮唑蓝)上海生工生物工程公司,RNA 提取试剂 Tripure 及 RT－PCR 试剂盒 Roche 公司。

1.2 细胞系培养和传代

HL－60 细胞引自重庆医科大学病生教研室,用含 10% 灭活小牛血清 RPMI－1640 培养基,置于 37℃,5%CO_2 孵箱中培养。

1.3 细胞增殖抑制分析

采用 MTT 法,实验分 3 组:(1)HL－60 细胞＋ASA(0～10mmol/L)(2)HL－60 细胞＋Ara－C100μg/ml(3)HL－60 细胞＋ASA2.5mmol/L＋Ara－C100μg/ml,同时配以空白组和试验对照,每组各 3 孔。每孔总体积 200μL。上述因素作用 68h 后加入 5mg/ml 的 MTT20μL 放回孵箱,4h 后,离心 1000r/min,5min 后去除上清,加入 150μL 二甲亚砜,振荡器上振荡 5min,酶标仪 560nm 波长处测定各孔 OD 值。按以下公式计算细胞抑制率:细胞抑制率(%)=(1－试验孔 OD

作者介绍:罗 云(1972－),男,住院医师,主要研究方向:血液肿瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

值/对照孔 OD 值)×100%。

1.4 细胞凋亡检测

1.4.1 细胞形态学观察 调节细胞浓度为 1.0×10^5/ml 左右,加入 ASA 各浓度,每日用 0.4% 台盘兰染液计数活细胞;收集细胞,离心涂片,瑞氏染色,光镜下观察。

1.4.2 流式细胞仪分析 不同终浓度 ASA 与 HL-60 细胞共孵育 72h 后,用 70% 乙醇 - 20℃ 固定过夜,洗涤后加 RnaseA 酶消化,PI 4℃ 避光染色 30min,FCM 上检测,出现亚 G1 峰细胞为凋亡细胞。

1.4.3 原位末端标记法(TUNEL)检测 采用原位细胞凋亡检测试剂盒(Roche 公司),按说明书操作。

1.5 RT-PCR 检测 c-myc mRNA 表达水平

按照 Roche 公司 hipure 试剂盒说明提取 RNA,RT-PCR 采用一步法,步骤参照说明书,约加改进:逆转录(RT)反应 60℃ 30min,PCR 反应 94℃ 2min 1 个循环,94℃ 30s、60℃ 30s、70℃ 60s10 个循环,94℃ 30s、60℃ 30s、70℃ 1min30s 25 个循环,70℃ 7min 1 个循环;引物设计 C-myc 5' 引物 CTCTCAACGACAGCAGCCCG; 3' 引物 AGGTGATCCAGACTCTGACC 扩增产物 250bpβ2 微球蛋白;5' 引物 ACCCCCACTGAAAAAGATGA; 3' 引物 ATCTTCAAACCTCCATGATG 扩增产物 154bp,两对引物均由上海生工生物工程公司合成。PCR 产物在 1.8% 琼脂糖(含 0.5μg/ml EB)凝胶电泳,DNA 凝胶成像系统观察分析。

1.6 统计学处理

采用方差分析,直线回归,χ^2 检验方法,均由 SAS6.12 软件处理,检验水准 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 ASA 对 HL-60 细胞增殖的影响

ASA 对 HL-60 细胞的增殖抑制作用与其剂量和作用时间有关,ASA 浓度增加,作用时间延长,增殖抑制作用增加。MTT 法显示不同浓度的 ASA 对 HL-60 细胞作用 72h 后,抑制率与药物浓度呈正相关,并且 100μg/mlAra-c 与 2.5mmol/L ASA 有相加作用。

表 1 ASA 对 HL-60 细胞的抑制作用($n=3, \bar{x}\pm s$)

	浓度	吸光度值	抑制率
ASA	0mmol/L	1.697±0.136	0
	2.5mmol/L	1.309±0.134*	22.86%
	5.0mmol/L	1.162±0.055*	31.53%
	7.5mmol/L	0.992±0.106*	41.54%
	10.0mmol/L	0.711±0.172*	58.10%
Ara-c	100μg/ml	1.020±0.108*	39.89%
ASA+Ara-c	2.5mmol/L +100μg/ml	0.646±0.136*	61.93%

注:* 与同一时间对照组相比,$P<0.01$

将细胞抑制率换算成概率单位,使曲线直线化,直线回归法求出回归方程,得到 IC50 为 8.97mmol/L。

2.2 细胞形态学观察

用 2.5~10.0mmol/L 的 ASA 处理 HL-60 细胞 48h 即可见早期凋亡细胞,形态学为细胞体积缩小,核浓缩,核仁消失,核碎裂。72h 可见晚期凋亡细胞,细胞膜完整,明显凹陷,皱缩,胞膜内含数量不等凋亡小体。另外在 7.5、10.0mmol/L ASA 作用下可见坏死细胞,表现为细胞膜破裂,空泡变性,细胞肿胀,细胞溶解。

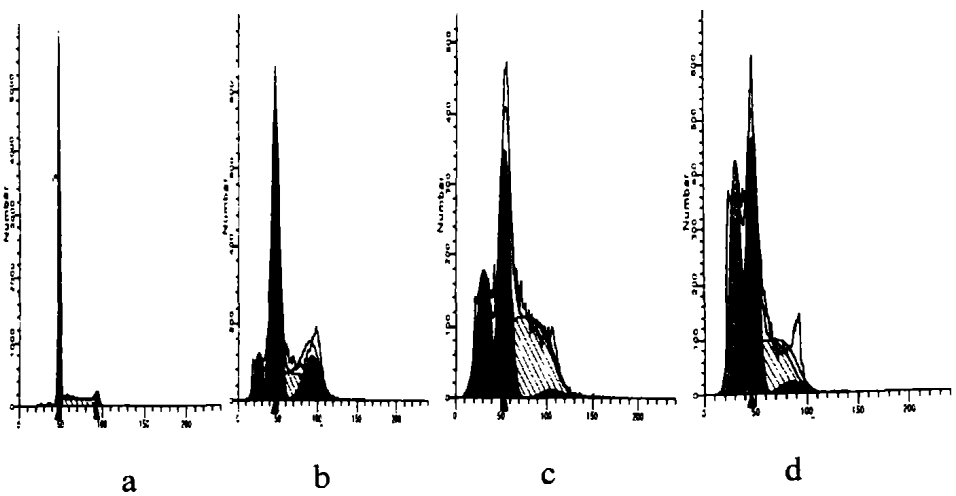


图 1 阿司匹林诱导 HL60 细胞凋亡的时相规律(FACS 分析图像)

a. 对照组(72h);b. ASA 2.5mmol/L(72h);c. ASA 5.0mmol/L(72h);d. ASA 10.0mmol/L(72h)

维普资讯 http://www.cqvip.com

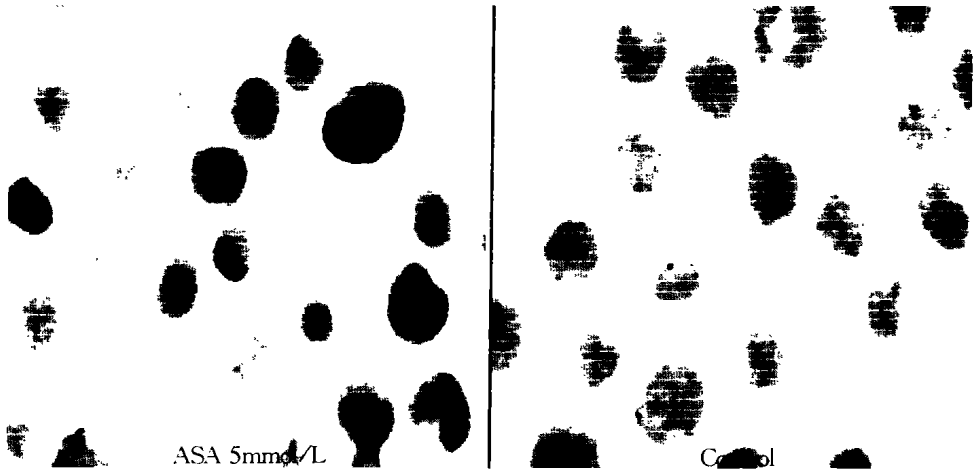


图 2 阿斯匹林诱导 HL60 细胞凋亡(TdT 染色)×1000

2.3 流式细胞仪检测结果

不同 ASA 作用 72h 后,FCM 显示有凋亡亚 G1 峰出现,并且随 ASA 浓度增加,HL-60 细胞凋亡率增加。2.5mmol/L,5.0mmol/L 及 10.0mmol/L 的 ASA 诱导凋亡率分别为 9.51%,22.60%,34.12%。

2.4 细胞凋亡 TUNEL 检测结果

细胞凋亡 DNA 断裂可通过 TUNEL 检测,原理为标记物质标记在凋亡细胞 DNA 断裂 3-OH 末端,凋亡细胞核染成棕色颗粒。HL-60 细胞经 ASA 作用后,细胞核中出现棕色颗粒,对照细胞则无此现象。

2.5 ASA 对 HL-60 细胞 c-myc 基因表达的影响

RT-PCR 时,以 β2 微球蛋白作为内对照来衡量目的基因的显示。结果显示 HL-60 细胞 c-myc 基因表达阳性;2.5mmol/L ASA 作用 12h 后可显著下调 c-myc mRNA 水平,24h 后恢复正常。

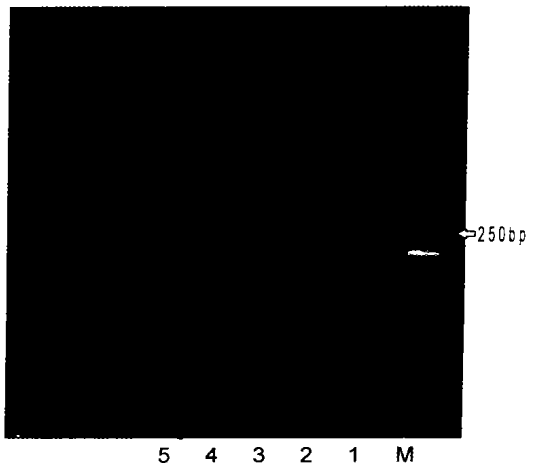


图 3 RT-PCR 结果

M:标准(marker);1,3,5 带:c-myc mRNA;2,4 带:β2-微球蛋白(β2-microglobin);5 带:对照组;3 带:ASA 2.5mmol/L 24h;1 带:ASA 2.5mmol/L 12h

3 讨 论

本试验观察到 2.5mmol/L～10.0mmol/L 的 ASA 对 HL60 细胞增殖有明显抑制作用,并证实随着作用时间的延长、浓度的增加其抑制作用也增加;经计算 IC50 值为 8.97mmol/L 与 Bellosillo 等[4]用 ASA 作用慢性 B 淋巴细胞性白血病细胞相似。阿糖胞苷是急性白血病化疗的常用药物,用 MTT 法分别测定 ASA(2.5mmol/L)或 Ara-c(100μg/ml)单独作用及 ASA+Ara-c 共同作用于 HL-60 细胞后的细胞增殖率,发现阿司匹林能增加 Ara-c 抗肿瘤细胞作用,其机制未明。Ara-c 属 S 期特异性药物,能诱导多种白血病细胞凋亡[5];有研究报告 ASA 诱导凋亡涉及神经酰胺的增多[6],ASA 对 Ara-c 抗 HL60 细胞表现的相加效应,是否涉及到凋亡信号的传导,有待进一步研究。

药物抑制肿瘤细胞增殖的原因有多种如:直接杀伤细胞,诱导细胞分化,诱导细胞凋亡等。已有研究证实 ASA 对 HL60 细胞没有诱导分化的作用[2]。因此本研究重点探讨 ASA 抑制 HL60 细胞增殖是否由于其诱导 HL60 细胞凋亡所致。凋亡与坏死是细胞死亡的两种形式。凋亡是在一定的生理或病理条件下遵循自身程序,自行结束生命的过程,细胞凋亡与肿瘤发生和抑制有密切关系。本研究选用几种方法综合判定 ASA 有诱导 HL60 细胞凋亡的作用:瑞氏染色光镜下见到了凋亡细胞,即有细胞膜染色质块状聚集,核裂解,凋亡小体出现等典型形态学改变;DNA 的核小体间水解;FCM 见到低于 2 倍体的 DNA 亚 G1 期峰;并证明了凋亡率随药物剂量增加而上升的规律。同时在 ASA7.5、10.0mM/L 作用 72h 后也可见到坏死细胞,其胞膜破坏、细胞溶解:

维普资讯 http://www.cqvip.com

表明较大剂量 ASA 对 HL60 细胞有直接的细胞毒作用。

细胞凋亡的机制极为复杂,迄今尚未完全阐明。细胞凋亡是在基因控制下的细胞自我消亡过程,它涉及到一个基因表达的级联反应,与细胞增殖和癌变有关的原癌基因和抑癌基因都参与了对细胞凋亡,研究较多的主要有 p53,c-myc,bcl-2/bax,caspases,Fas/APO-1 等。由于 HL60 细胞内缺乏 p53 基因表达,因此 ASA 诱导细胞凋亡机理不应涉及 p53 基因。c-myc 基因是一个对 HL60 细胞生长,增殖、分化,凋亡都有重要影响的基因。大量文献表明当 HL60 被多种化学诱导剂诱导产生分化,凋亡及生长抑制时几乎都有 c-myc 表达的明显下降[7,8]。本研究用半定量 RT-PCR 检测 c-myc 基因,结果显示在 ASA 诱导 HL60 细胞 12h 后下调,而 24h 后恢复,表明其在药物作用早期有一定作用。ASA 诱导 HL60 细胞凋亡是否涉及其他原癌基因和抑癌基因,以及其传导信号尚待研究。

综上所述,ASA 对急性白血病细胞具有抗增殖和诱导凋亡作用;ASA 对 Ara-c 的抗白血病作用具有协同作用。C-myc 基因表达的下调至少部分参与细胞凋亡的机制。

参 考 文 献

[1] Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic pharmacologic and clinical issues[J]. J Natl Cancer Inst, 2002; 94(4): 252-266.

[2] Sokoloski JA, Sartorelli AC. Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by nonsteroidal anti-inflammatory agents in combination with low levels of vitamin D3[J]. Leuk Res, 1998; 22(2): 153-161.

[3] Klampfer-L, Cammenga-J, Wisniewski-HG, et al. Sodium salicylate activates caspases and induces apoptosis of myeloid leukemia cell lines[J]. Blood, 1999; 93(7): 2386-2394.

[4] Bellosillo-B, Pique-M, Barragan-M, et al. Aspirin and salilylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells [J]. Blood, 1998; 92(4): 1406-1414.

[5] Strum JC, Small GW, Pauig SB, et al. 1-beta-D-Arabinofuranosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells[J]. J Biol Chem, 1994; 269(22): 15493-15497.

[6] Chan-TA, Morin-PJ, Vigelstein-B, et al. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis[J]. Proc-Natl-Acad-Sci-USA, 1998; 95(2): 681-686.

[7] Ben-Baruch N, Reinhold WC, Alexandrova N, et al. C-myc Down-regulation in suramin-treated HL60 cells precedes growth inhibition but does not trigger differentiation[J]. Mol Pharmacol, 1994; 46(1): 73-78.

[8] Masuda Y, Kawazoe N, Nakajo S, et al. Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells[J]. Leuk Res, 1995; 19(8): 549-556.

(上接第 283 页)凝血时间延长、血小板功能下降,肝功检查谷丙转氨酶和谷草转氨酶指标超过正常值,心肌酶谱指标均出现异常。3 个月后复查时 5 名学生又出现凝血时间延长、血小板功能下降,8 名学生心肌酶谱指标异常。

3 对 论

(1)5 至 6 岁的儿童由于好奇和认知能力的限制,未能辨识鼠药,是这次误食中毒的主要原因。因此,学校应对低年级尤其是学前班儿童加强安全行为规范教育和管理,最大限度的防止意外发生。(2)学前班儿童受认知能力和表达能力的局限,不可能及时向老师报告有关事件的准确情况,学校发现发生公共卫生突发事件后应及时向卫生行政部门报告,便于及早介入,调查追踪事情经过,及时组织好救治工作,并将有关资料妥善上报主管部门。(3)学前班儿童不能提供完整、准确的信息,医师在处理时应认真做好体检和相应的实验室检查,及时进行洗胃等处理,以减少毒物在体内继续留存和吸收。(4)目前我市使用的香豆素类鼠药主要破坏机体的凝血机制,本次中毒事件中,9 名学生均出现了不同程度的凝血功能损害,持续时间较长,程度较重;肝功能损害持续时间较短,程度较轻。因此,此类病人出院后最好半年内每月到医院随访且复查凝血功能和心功能。治疗过程中针对凝血系统功能障碍进行处理,VK1 是首选治疗药物。并且在治疗和恢复过程中 VK1 的使用时间应该适应延长。(5)灭鼠是一项经常性工作,但灭鼠药的投放应严格执行相关规定,在儿童群聚的场所必须待儿童离开后方可投放,并及时收回。(6)灭鼠药的生产应该考虑色彩不要太艳丽,避免幼儿误判断造成意外伤害。(7)从本次中毒事件发生后的处理情况看,学校在发生突发事件后,未报告当地卫生行政部门,介入调查时间在误服后 10h。说明在《突发公共卫生事件应急条例》出台后,报告程序还不完善且未渗入到基层,相应的法定报告人责任也不太明确。因此地方各级政府应当将国务院的《突发公共卫生事件应急条例》根据具体情况拟定实施细则,明确责任,以达到更好贯彻《突发公共卫生事件应急条例》。