维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0059-03

柔红霉素体外对HL-60细胞的凋亡作用

陈 敏[1]，冯文莉[1]，黄宗干[2]

（1. 重庆医科大学医学检验系临床血液学教研室，2. 重庆医科大学临床学院血液科 重庆 400016）

【摘 要】目的：了解柔红霉素（DNR）体外作用于HL-60细胞时产生凋亡的规律及一些相关蛋白表达的变化。方法：应用光镜、DNA电泳及FCM检测HL-60细胞发生的凋亡模式；用IC、FCM观察相关蛋白的变化。结果：当DNR浓度为0.2μM~2μM时，HL-60细胞发生的凋亡率随浓度的增加与作用时间的延长而升高，可见典型的凋亡细胞及明显的DNA梯度条带。1μM DNR作用2h时，bcl-2与c-myc的荧光强度指数（FI）降低、bax、caspase-3的FI升高；而作用5h时、bax、caspase-3的FI值反而降低。结论：一定浓度的DNR在体外可诱导HL-60细胞凋亡、它可抑制bcl-2与c-myc蛋白的表达、而激活bax、caspase-3蛋白的表达。

【关键词】柔红霉素；细胞凋亡

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-02-25

The apoptosis effect of daunorubicin on HL-60 cells in vitro

CHEN Min, et al

(Department of Clinic Laboratory Medicine,Chongqing Medical University,400016)

【Abstract】 *Objective*: To learn about the apoptosis role of HL-60 cells induced by DNR in vitro and the expression change of some protein.*Methods*: This study observed the apoptosis of HL-60 by optic microscope, flow cytometry (FCM) and DNA electrophoresis and detected changes of various apoptosis-associated proteins expression with immunocytochemistry (IC) and FCM assays. *Results*: When treated with 0.2 μM~2 μM DNR, the percentage of apoptotic HL-60 cells increased with the increase of dose and the extension of time, and there showed the typical apoptotic cells and the appearance of apoptotic DNA ladder. It was shown that after HL-60 cells were treated with 1uM DNR for 2h, the fluorescence intensity index(FI) of both bcl-2 and c-myc decreased, bax and caspase-3 increased; at 5h, the FI of bax and caspase-3 decreased on the contrary. *Conclusion*: It is suggested from the results that at the certain concentration, DNR can induce the apoptosis of HL-60 in vitro, and it can suppress the expression of bcl-2,c-myc and activate bax and caspase-3.

【Key words】 Daunorubicin; Cell apoptosis

化疗是目前治疗急性白血病最基本与重要的手段。DNR是治疗方案的主要组成药物。对DNR的治疗作用的研究目前仅停留在它与癌细胞DNA分子的相互作用及其在体内的代谢阶段。而现在已发现许多化疗药物均可诱导肿瘤细胞凋亡[1]，提示细胞凋亡在急性白血病化疗中有重要意义。为此，我们观察了DNR在体外诱导急性髓细胞白血病系HL-60细胞的凋亡模式、并检测了一些与凋亡相关的蛋白表达。

1 材料与方法

作者介绍：陈 敏（1975- ），女，技师、硕士，

主要研究方向：白血病的分子发病机理。

1.1 主要试剂

HL-60细胞系（重庆医科大学儿童医院免疫室）、RPMI 1640（GIBCO）。抗bcl-2等小鼠抗人单抗及FITC标记的羊抗鼠多抗IgG、SP免疫组化检测试剂盒（北京中山生物技术公司）。DNR（Pharmacia&Upjohn）。Marker（pBR322 DNA/AluI: MBI Fermentas）。

1.2 细胞培养

HL-60传代培养于含10% FCS的PRMI 1640，5% CO_2，饱和湿度中，试验前24h换液，用0.4%台盼蓝染色鉴定活性在98%以上。

调节HL-60为1×10^6/ml，加入DNR使终浓度分别为0.2、0.5、1、2、5μM，作用5、12、24h后，用台盼蓝染色鉴定细胞的活力、并用瑞氏染色光镜观察细胞形态。

1.3 凋亡率检测

收集细胞，70%乙醇-20℃固定，洗涤，加RNaseA消化、PI 4℃避光染色30min，FCM检测。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 DNA电泳[2]

调HL-60为1×10⁶/ml，加入DNR，使终浓度为0.1μM、0.5μM、1μM、2μM、5μM，作用5h，收集细胞，PBS洗两次，70%乙醇-20℃固定，离心去乙醇，PBS洗涤后加入柠檬酸缓冲液40μl，室温作用60min，间隙振摇。离心后，取上清，加入10μl RNA酶作用30min，10μl蛋白酶K作用30min后，4℃保存备用。并于2%琼脂糖，60V，电泳90min，在凝胶成像系统中观察，成像。

1.5 蛋白检测 调HL-60为1×10⁶/ml，用1μM的DNR作用2h、5h，制备细胞离心涂片，用常规SP染色检测上述四种蛋白的表达，计算阳性细胞率。

收集细胞1×10⁶，PBS洗一次，0.4%多聚甲醛固定后，再用70%甲醇作用30min，加入小鼠单抗1μg/5μl 4℃悬浮1h，洗涤，再加FITC标记的羊抗鼠IgG（稀释度为1：40）于避光处冰浴30min，PBS洗两次，立即用FCM检测荧光强度。计算荧光强度指数（fluorescence intensity index，FI）及相对荧光强度指数（relative fluorescence intensity index，RFI）[3]。

FI=（实验样品的平均荧光强度-阴性对照样品的平均荧光强度）/阴性对照样品的平均荧光强度。

RFI=实验处理细胞的FI/实验对照细胞的FI。

RFI可定量算出同一批细胞的各种蛋白的相对含量，反映了蛋白表达的强弱。

1.6 统计学方法

t检验，χ^2检验

2 结 果

2.1 DNR诱导HL-60细胞凋亡的形态学观察

1μM DNR作用HL-60细胞5h后，在瑞氏染色光镜下观察到典型的凋亡细胞：其细胞膜完整，可出现体积缩小、胞质减少、核染色质浓缩、聚集、碎裂，胞膜起泡，有的小泡脱落胞体形成凋亡小体(见图1)。

2.2 FCM分析0~5μM DNR作用后HL-60细胞的凋亡率

DNR作用后，出现明显的凋亡峰。凋亡细胞数随浓度增大而明显增多（$P<0.01$）；至5μM时，凋亡率下降。而在同一浓度DNR作用下、12h前凋亡率上升迅速($P<0.01$)，以后逐渐趋于平稳（见表1）。

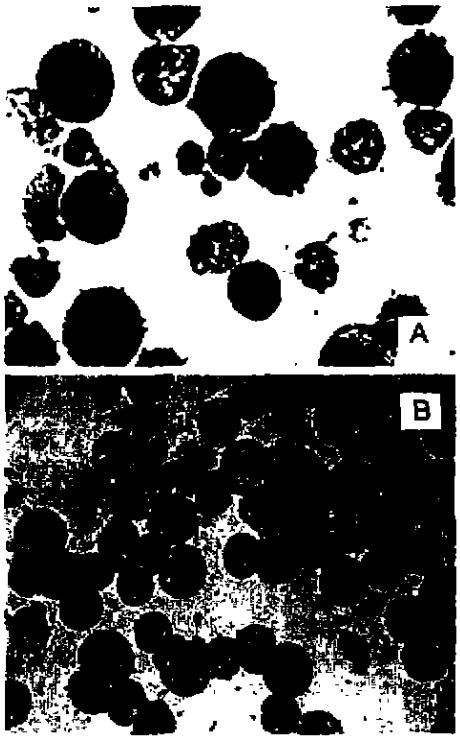


图1 DNR作用前后，HL-60细胞的瑞氏染色图

a. 对照细胞(×200)；b. 1μM DNR作用5h(×400)

2.3 DNA电泳

DNR作用5h下，浓度为0.1μM时仅有一条亮带、而至0.5~2μM时，出现了典型的DNA凋亡梯

表1 FCM检测DNR作用HL-60下的凋亡率（%）

DNR（μM）	5h	12h	24h
0	3.2	5.7	4.9
0.2	12.78	19.53	20
0.5	13.66	28.83#	32.06
1	21.9△	60.35	65.56
2	41.87	—	—
5	11.7	—	—

χ^2 test: # vs 0.5μM+5h, $P<0.01$, — vs 1μM+12h, $P<0.005$, △ vs 0.5μM+5h, $P<0.01$, # vs 0.5μM+24h, $P>0.05$。

表2 FCM法检测DNR作用前后HL-60细胞内四种蛋白的表达（FI值及RFI值）

DNR(1μM)作用时间	Bcl-2		C-myc		Bax		Caspase-3	
	FI	RFI	FI	RFI	FI	RFI	FI	RFI
0h	0.481	—	1.083	—	0.201	—	0.255	—
2h	0.352	0.732	1.131	1.044	0.855	4.238	0.895	3.511
5h	0.337	0.701	0.869	0.802	0.316	1.567	0.331	1.296

维普资讯 http://www.cqvip.com

形图象，再高至5μM时，图象为涂片样连续亮区（见图2）。

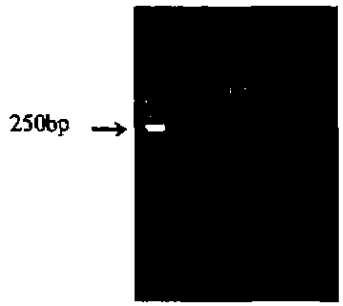


图2 DNR作用前后HL-60细胞的DNA电泳图

2.4 IC法检测

在DNR处理前bcl-2、c-myc为强阳性，阳性率为97.9%、99.6%；bax、caspase-3呈微弱阳性表达。DNR作用2h时，bcl-2、c-myc蛋白表达的阳性程度降低；bax、caspase-3呈现阳性表达。

2.5 FCM检测

当用1μM DNR作用5h时，c-myc表达稍有降低，bcl-2的表达也逐渐降低；而bax、caspase-3的表达在作用2h时迅速增强，至5h时反而降低（见表2）。

3 讨 论

柔红霉素（DNR）是急性白血病化疗方案的基本药物，它是一种蒽环类抗生素，其有破坏DNA、抑制拓扑异构酶Ⅱ（TopoⅡ）等作用、这些既是抗肿瘤的，但同时对正常细胞的损伤又导致了较强的副作用[4]。Kaufmann等人首次报道化疗药可作为一种死亡信号，激活肿瘤细胞的共通死亡途径（即凋亡）[5]。

在本实验中，用DNR体外作用HL-60细胞，观察其是否诱导凋亡。结果显示，0.2~2μM DNR作用5h，可诱导HL-60细胞产生可用形态学、FCM及DNA电泳检测到的凋亡，同时观察了0.05μM及0.1μM的作用情况时发现，虽短时间内不能诱导凋亡，但当作用时间延长至48h时，凋亡率分别可达5.8%及50%（资料未显示）。提示DNR在细胞浆或核内积累后对细胞的损伤达一定程度即可诱导细胞凋亡。但若DNR浓度过高，对细胞的损伤过大，细胞失去对刺激的反应性而趋向坏死。

已证明与凋亡相关的蛋白有多种，常有癌基因与抑癌基因的参与。本实验的结果显示，bcl-2/bax值在DNR诱导后逐渐下降，提示凋亡的产生与bcl-2家族蛋白的表达变化有关。同时观察到c-myc在DNR诱导后，其表达仅轻度降低，仍维持一较高水平，提示DNR对HL-60细胞内c-myc表达的影响很小。

caspase是细胞凋亡调控的关键分子群(caspase 1~14)，其中caspase-3被证明是介导凋亡表型形成所必需的[6]。本文的结果显示，发生凋亡后，caspase -3表达明显升高。

本实验比较了1μM DNR作用HL-60细胞2h与5h时几种蛋白的表达情况，结果提示：在DNR作用早期，是诱导细胞凋亡最活跃的时期，各种蛋白变化也较明显。随着作用时间延长，对DNR敏感的HL-60细胞已发生了凋亡，细胞碎裂，而一些抗凋亡、蛋白表达不发生变化的细胞维持活性，这类细胞内的bax、caspase-3低表达，出现了平均荧光强度反而升高的情况。

综上所述，一定浓度的DNR在体外可诱导HL-60细胞凋亡，凋亡率与DNR的剂量与作用时间相关；DNR可抑制HL-60细胞内bcl-2与c-myc蛋白的表达，而激活bax、caspase -3蛋白的表达。但DNR诱导HL-60细胞凋亡的机制还需作进一步的探讨。

参 考 文 献

[1] 艾辉胜，罗荣诚，乐晓峰. 现代白血病学[M]. 第一版，北京：人民军医出版社，1997;171-201.

[2] Jaffrezou JP, Levade T,Bettaieb A, et al. Daunorubicin induced apoptosis: trigering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis[J]. EMBO J,1996;15:2741-2 7 24.

[3] Ling V. Dose P-glycoprotein predict response to chemotherapy[J]? J Natl Cancer Inst,1998;81:84-89.

[4]Richardson DS, Johnson SA. Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems[J]. Blood Rev, 1997;11:201-223.

[5] Kaufmann S. Induction of endonuleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin and other cytotoxic anticancer drugs: A cautionary note[J]. Cancer Res,1989;49:5870-5878.

[6] Villa P, Kauffman SH, Earnshaw WC. caspase and caspase inhibitors[J]. Trend Biochen Sci ,1997; 22: 388-393.