

甲异靛对 K562 细胞凋亡的影响*

宋鲁燕 钱林生

内容提要 目的:研究甲异靛对人慢性粒细胞白血病细胞系 K562 细胞的影响,探讨甲异靛治疗慢性粒细胞白血病(CML)的作用机理。方法:应用剂量反应曲线,台盼蓝拒染实验,细胞形态学,DNA 电泳,流式细胞仪及 TUNEL 标记等多种方法观察甲异靛对 K562 细胞的作用。结果:甲异靛能明显抑制 K562 细胞的增殖,并同时诱导 K562 细胞凋亡。结论:甲异靛治疗 CML 的机理可能与甲异靛引起白血病细胞受抑和细胞发生凋亡有关。

关键词 甲异靛 慢性粒细胞白血病 细胞凋亡

Apoptosis Inducing Effect of Meisoindigo on K562 Cells Song Luyan, Qian Linsheng *Institute of Hematology and Hospital of Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin (300020)*

Objective: To study the effect of meisoindigo on human chronic myelogenous leukemia (CML) cell line K562 cells for exploring the mechanism of meisoindigo in treatment of CML. **Methods:** Multiple methods, including dose-response curve, trypan blue exclusion, cytomorphology, DNA electrophoresis, flow cytometry and TUNEL (TdT mediated dUTP nick and labeling), were used to observe the effect of meisoindigo on K562 cells. **Results:** Meisoindigo can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of K562 cells. **Conclusion:** The therapeutic mechanism of meisoindigo in treating CML may be related with its proliferation inhibiting and apoptosis inducing effect in CML cells.

Key words meisoindigo, chronic myelogenous leukemia, apoptosis

甲异靛是由靛玉红发展而来的其结构骨架不同与靛玉红的一种新型双吲哚类药物。经临床试验证实:甲异靛治疗慢性粒细胞白血病(CML)有良好的疗效⁽¹⁾。既往研究表明甲异靛可能通过抑制肿瘤细胞增殖及促进肿瘤细胞分化达到对肿瘤的治疗作用⁽²⁾。为进一步探讨甲异靛的作用机理,我们观察甲异靛对 K562 细胞的诱导凋亡作用。

材料和方法

1 制剂 甲异靛由中国医学科学院药物研究所提供,用二甲基亚砜(DMSO)配制成浓度为 20 μ mol/ml 的储存液,保存于 -20 $^{\circ}$ C,使用时用 IMDM 稀释成所需浓度,保存于 4 $^{\circ}$ C。

2 细胞培养 以 5 $\times 10^5$ /ml 的浓度接种 K562 细胞(由我所细胞培养室提供)于含 20% 胎牛血清的 IMDM 培养液中,各设空白对照组及不同甲异靛剂量(20、35、50、75、100nmol/ml)的加药组。分别在药物作用后的第 1 天、第 2 天、第 3 天时收集细胞,台盼蓝

染色,计数活细胞数,计算细胞活力。

细胞活力(%) = 活细胞数/总细胞数 $\times 100\%$

3 细胞形态观察 收集细胞经洗涤后,固定于 2.5% 戊二醛液中 2h,常规包埋,切片,醋酸铀、枸橼酸铅染色后,电子显微镜观察。

4 流式细胞仪检测 在各组细胞培养液中分别取 1 $\times 10^6$ 个细胞,PBS 洗涤后用 70% 冷乙醇固定 24h 以上,随后清洗细胞,碘化丙锭 DNA 染色。经流式细胞仪分析不同 DNA 含量的细胞分布。资料均经 Modfit LT 软件收集、贮存和评价。

5 DNA 电泳 参见文献⁽³⁾,略有修改。将 10⁶ 个细胞重悬于 20 μ l 细胞裂解液中,50 $^{\circ}$ C 孵育 1h。加入 5 μ l 1mg/ml RNA 酶,50 $^{\circ}$ C 作用 1h。然后加 10 μ l 含 1% 低熔点琼脂糖凝胶加样缓冲液,加热到 70 $^{\circ}$ C 作用 10min 后,加样到含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶干孔中,4 $^{\circ}$ C 冷却 5min。在 50V 电压下电泳 3h。

6 凋亡细胞 DNA 片段的 TUNEL 标记 按试剂盒(购自 Boehringer 公司)说明书进行。

7 统计学处理 数据资料用 t 检验(POMS-04 计算机软件处理)。

* 本课题受卫生部课题基金(96-1-071)资助

中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所血液病医院(天津 300020)

结 果

1 甲异靛对 K562 细胞生存的影响 见图 1、2。20~100nmol/ml 的甲异靛能明显抑制 K562 细胞的生长,与空白对照组比较有显著性差异($P < 0.01$);但 K562 细胞活力无明显改变,100nmol/ml 甲异靛作用 3 天,细胞活力在 70% 以上。说明甲异靛抑制细胞生长的方式不是以细胞毒作用为主。甲异靛也能抑制 HL-60 细胞的生长,但细胞活力随药物浓度的增加、作用时间的延长而明显下降。

2 甲异靛诱导 K562 细胞凋亡 20~75nmol/ml 甲异靛作用 K562 细胞后,通过细胞形态学、细胞 DNA 含量、DNA 电泳及 DNA 末端标记等方法检测细胞凋亡。发现 75nmol/ml 的甲异靛作用 K562 细胞 24h,细胞出现下列变化:(1)电镜观察出现典型的凋亡细胞的形态学改变:核染色质固缩,向周边聚集呈月牙状斑

块,并形成凋亡小体(见图 3)。(2)流式细胞仪分析 DNA 含量分布,显示典型的凋亡细胞群,其 DNA 含量低于 G_1 期细胞,亚二倍体细胞含量为 $(30.32 \pm 4.04)\%$,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$)。药物作用前后细胞周期无明显变化,见表 1。(3)DNA 电泳未发现梯形图谱。(4)TUNEL 标记阳性细胞指数(PI, $\bar{x} \pm s$)空白对照及甲异靛 20、35、50、75nmol/ml 组分别为 0、 $(1.10 \pm 0.36)\%$ 、 $(1.10 \pm 0.36)\%$ 、 $(4.00 \pm 2.00)\%$ 、 $(12.30 \pm 2.50)\%$,甲异靛各组与空白对照组比较均有显著性差异($P < 0.05$)。甲异靛 75nmol/ml 组 PI 为 $(12.30 \pm 2.50)\%$ 时,台盼蓝拒染实验检测的细胞活力为 100%。说明甲异靛抑制 K562 细胞增殖活性不是甲异靛的非特异细胞毒作用,可能与甲异靛诱导细胞凋亡有关。同样条件下的甲异靛作用 HL-60 细胞后,电镜下没有发现凋亡细胞的特征性改变。

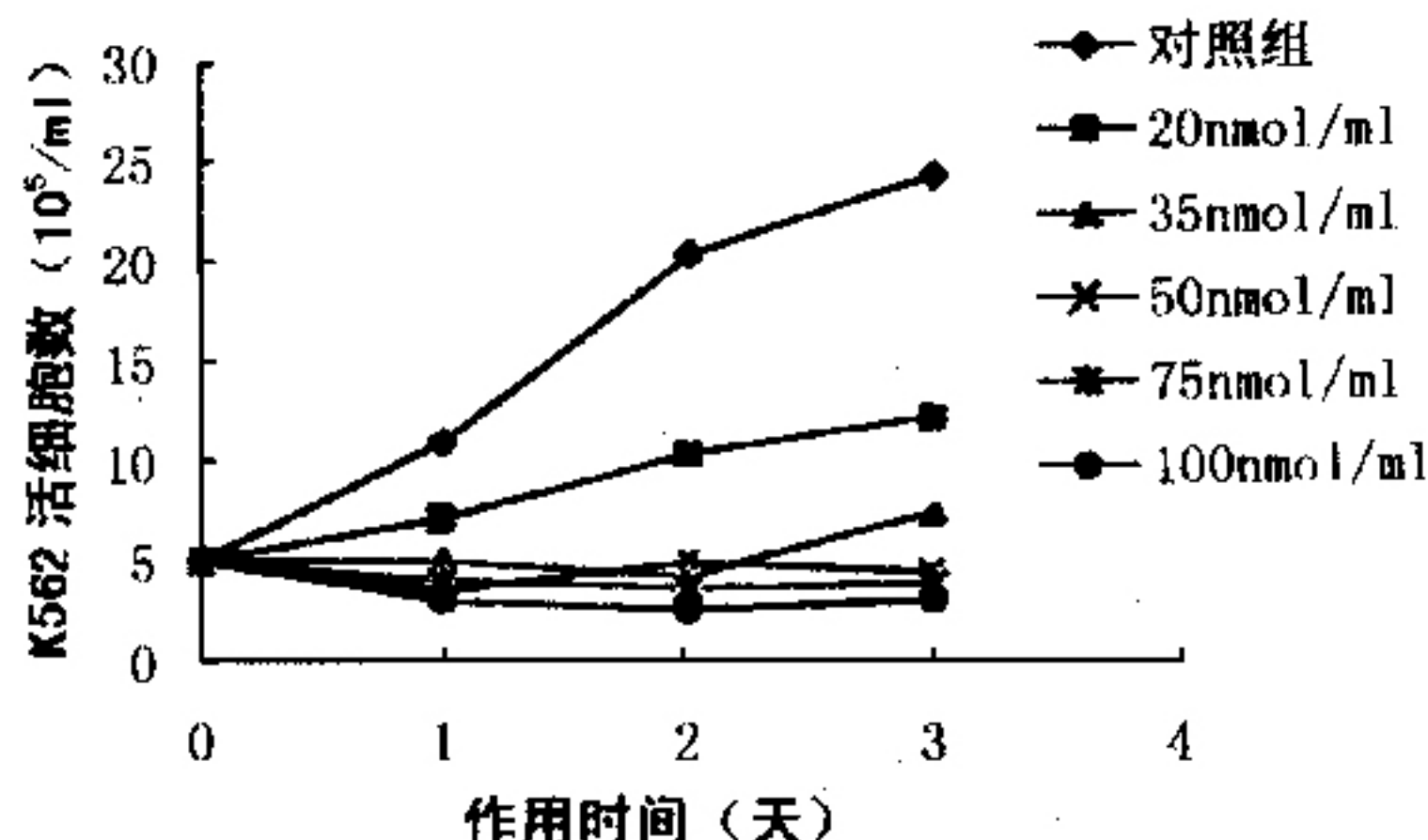


图 1 不同浓度甲异靛作用下 K562 细胞数的变化

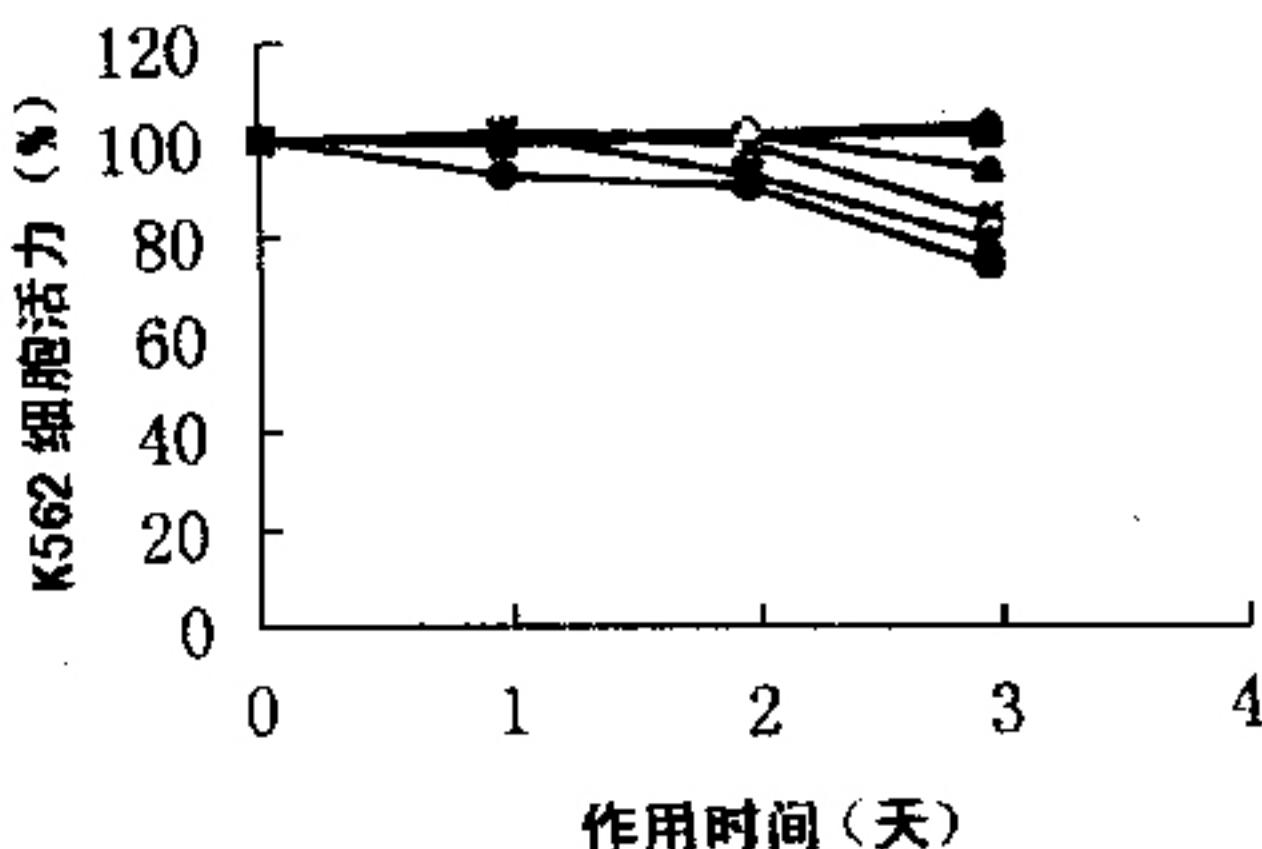


图 2 不同浓度甲异靛作用下 K562 细胞活力的变化

表 1 甲异靛对 K562 细胞 DNA 含量及周期的作用 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	亚二倍体细胞	G_0/G_1 期	S 期	G_2-M
空白对照	7.06 ± 3.51	98.83 ± 2.04	1.17 ± 2.04	0
甲异靛				
20nmol/ml	10.70 ± 1.95	97.64 ± 1.35	0.94 ± 1.25	1.42 ± 1.67
35nmol/ml	23.75 ± 3.69	99.52 ± 0.68	0.40 ± 0.67	0.08 ± 0.90
50nmol/ml	18.88 ± 2.88	98.51 ± 2.26	1.22 ± 2.11	0.03 ± 0.24
75nmol/ml	$30.32 \pm 4.04^*$	97.47 ± 3.76	2.28 ± 3.95	0.25 ± 0.43

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

中国医学科学院血液学研究所当归芦荟丸治疗 CML 的基础上,1997 年发现青黛中的靛玉红治疗 CML 有良好的效果,但是,约 2/3 患者服用靛玉红后有不同的消化道副作用⁽⁴⁾。为了降低毒性和提高其疗效,1982 年中国医学科学院药物研究所通过对靛玉红分子和晶体结构分析,对该化合物的高熔点,低溶

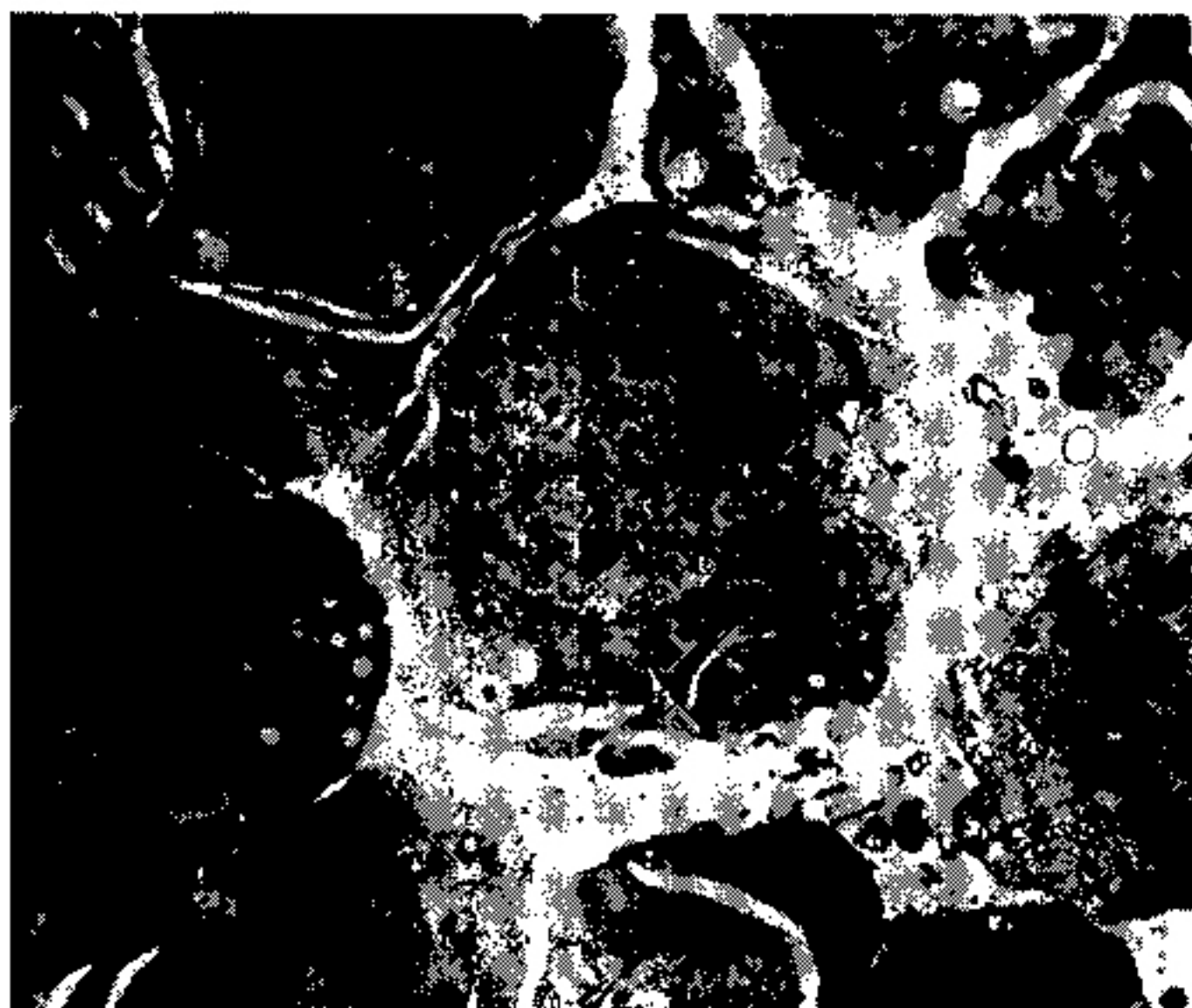


图 3 75nmol/ml 甲异靛作用 24h 的 K562 细胞电镜图象显示胞体变小、胞浆浓缩、凋亡小体形成(3000 $\times$)

解度,体内吸收差和生物利用度低等缺点的相关性研究,定向设计全合成靛玉红的类似物——甲异靛,经 I、II、III 期临床试验证实,甲异靛对治疗 CML 有良好的疗效。

对甲异靛的作用机理进行了初步的研究,结果为:(1)甲异靛抑制小鼠 Lewis 肺癌和大鼠 Walker256 的癌细胞 DNA 及 RNA 的生物合成,抑制微管蛋白聚合,并对 T₇RNA 多聚酶有明显的抑制作用,还可阻断小鼠 L₁₂₁₀ 细胞由 G₂ + M 期向 G₁ 期移动,引起 S 期堆积。但对 DNA 模板及 DNA 拓扑异构酶 II 和 DNA 多聚酶 I 无明显的抑制作用⁽⁵⁾。(2)甲异靛对原粒细胞白血病 ML-1,在适宜浓度下也可引起酸性磷酸酶活性增强,细胞趋向成熟。总之,以上机制研究表明甲异靛可能通过抑制肿瘤细胞增殖及促进肿瘤细胞分化达到对肿瘤的治疗作用。

一般认为,核小体 DNA 裂解,在琼脂糖凝胶电泳上形成梯状(ladder)图谱是凋亡特征性的生化学改变。然而最近发现:凋亡细胞核的特征性改变并不总是与 DNA 梯形电泳相关^(6,7)。Falcieri 等⁽⁸⁾用蛋白酶抑制剂星形孢菌素作用人淋巴细胞白血病 MOLT-4 细胞系,出现特征性的凋亡细胞的形态学改变:核染色质固缩,向核周边聚集呈月牙状斑块等,但 DNA 电泳未观察到典型的梯状图谱。Cohen 等⁽⁹⁾将小鼠的胸腺细胞与凋亡诱导剂地塞米松和抑制剂锌离子共同培养,发现锌离子虽能完全抑制 DNA 梯形电泳图谱的形成,但细胞形态学观察仍能出现凋亡的特征性改变。说明有些细胞发生凋亡时,染色质 DNA 并不降解,即 DNA 降解并不是凋亡必不可少的内容。本实验发现:75nmol/ml 甲异靛作用 K562 细胞 24h 后,电镜下观察出现典型的凋亡细胞核的改变,但琼脂糖凝胶电泳未观察到 DNA 梯形图谱,并证实甲异靛能诱导 K562 细胞发生凋亡。

DNA 含量分析和 DNA 断裂点分析是近来经常采用的方法。然而最近有人提出⁽¹⁰⁾:这些技术并不是检测凋亡细胞特异的方法,坏死及分裂中期的细胞也可出现阳性标记。因此他们提出应当首先确定细胞形态学的改变,再进行 DNA 含量分析和末端标记实验。本实验中,75nmol/ml 甲异靛作用 K562 细胞 24h,流式细胞仪分析 DNA 含量,在二倍体细胞前出现一个亚二倍体峰;TUNEL 标记也有阳性结果,同时电镜下

也发现凋亡细胞的特征性改变,进一步证实甲异靛选择性作用于 K562 细胞,诱导其凋亡。

综上所述,本实验在肯定甲异靛能抑制 K562 细胞生长的同时,用多种方法证实甲异靛作用后的 K562 细胞有典型的凋亡发生,但其详细机制有待于进一步阐明。实验结果为甲异靛治疗 CML 的作用机理的研究提供了基础。

参 考 文 献

1. 甲异靛 III 期临床试验协作组. 甲异靛治疗慢性粒细胞白血病 III 期临床观察. 中华血液学杂志 1997; 18(2):69—72.
2. 籍秀娟, 张福荣. N-甲基异靛蓝的抗肿瘤作用. 药学学报 1985; 20(4):247—251.
3. Smith AC. Antibody to CD₃/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cell in thymic cultures. Nature 1989; 337(6203):181.
4. 靛玉红治疗协作组. 靛玉红治疗 314 例慢性粒细胞白血病的临床研究. 中华血液学杂志 1980; 1(4):132.
5. 刘晓梅, 王龙贵, 籍秀娟. 甲异靛抑制 DNA 和 RNA 生物合成的抗癌作用机理. 中国药理学与毒理学杂志 1991; 5(3):204—207.
6. Oberhammer F, Fritsch G, Schmied M, et al. Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. J Cell Sci 1993; 104(5):317—326.
7. Zakeri ZF, Guagliano D, Latham T, et al. Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. FASEB J 1993; 7(5):470—478.
8. Falcieri E, Martelli AM, Bareggi R, et al. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. Biochemical and Biophysical research communications 1993; 193(1):19—25.
9. Cohen GM, Sun XM, Snoden RT, et al. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. Biochem J 1992; 286(2):331—334.
10. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, et al. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. J Pathol 1993; 170(1):1—8.

(收稿:1998-10-16 修回:1999-03-10)