

棉酚对髓系白血病细胞凋亡的影响*

王文清 黄高昇 梁蓉 张伟平 王娟红 李袁飞 刘宇宏 白庆咸 陈协群
第四军医大学基础部病理学教研室 (西安市 710033)

摘要 目的 本实验拟通过棉酚对3种经典髓系白血病细胞系的研究,探索其治疗白血病的可能。方法 用细胞培养、四唑盐比色试验、形态学、DNA电泳等方法观察棉酚对白血病细胞的凋亡效应。结果 棉酚在浓度>6 μmol/L时可选择地抑制白血病细胞的增殖、促进其凋亡,并表现出浓度依赖效应。结论 棉酚对髓系白血病细胞具有选择杀伤作用,表明其可能是一种高效低毒的抗白血病药物。

关键词 棉酚 髓系白血病 增殖 凋亡 药物作用

中图分类号 R733.7 文献标识码 A 文章编号 :1000-8179(2006)19-1122-03

Effects of Gossypol on Apoptosis in Myeloid Leukemia Cells

Wang Wen-qing Huang Gao-sheng Liang Rong et al

Department of Pathology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an

Abstract Objective: Nowadays, the main treatment on leukemia is traditional radiochemotherapy with serious side effects and discouraged long time effects. It is necessary to look for new drugs for leukemia therapy. To study the possibility to treat leukemia with gossypol, we investigated the effects of gossypol on apoptosis in 3 classic human myeloid leukemia cell lines. Methods: The cytotoxic activity of gossypol on leukemia cell lines were detected by means of MTT assay. Apoptosis was identified and analyzed by morphology, cell cycle, and DNA gel electrophoresis, etc. Result: Our data showed that gossypol could selectly suppress the proliferation and induce apoptosis in all the three myeloid leukemia cell lines in a dose dependent manner (>6 μM). Conclusion: Gossypol could selectively induce apoptosis in the myeloid leukemia cell lines. It suggests that gossypol may be an ideal drug for leukemia therapy.

Key words gossypol myeloid leukemia proliferation apoptosis drug effects

白血病是严重威胁人类生命的恶性肿瘤,其发病率有显著升高的趋势^[1]。当前该疾病的治疗仍主要采取传统的放化疗,毒副作用显著。寻找高效低毒的新型治疗药物,显得非常必要。

近年来,多酚类药物的抗肿瘤作用日益受到学术界的重视。作为该类药物的一分子,棉酚(Gossypol, GL)存在于锦葵科某些植物的根、茎、种子中,分

子量为518.54,曾作为男性节育药为人们所熟知^[2]。研究表明,棉酚还是一种新型的抗实体瘤药物^[3],但对血液肿瘤的研究还很少见。本实验通过棉酚对3种经典髓系白血病细胞系进行研究,观察对其增殖、凋亡的影响。结果表明,棉酚可以选择性地抑制其增殖、促进凋亡。提示该药可能是一种很有前途的新型抗白血病药物,有望进入临床应用。

* 本文课题受国家自然科学基金资助(编号:30171186)

第四军医大学附属西京医院血液内科

通讯作者:黄高昇 huanggs@fmmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞系、红白血病 K562 细胞系、急性单核细胞白血病 U937 细胞系、骨髓成纤维样基质细胞系 HFCL 由本室常规保存。正常人外周血单个核细胞(PBMNCs)由西京医院输血科正常献血白细胞层分离。以上细胞除 HFCL 采用 10%胎牛血清(FBS)的 IMDM 培养基外,其余均以 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基,置 37^oC, 5%CO₂, 饱和湿度的孵箱常规培养。

1.1.2 试剂 IMDM、RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,按说明配制。棉酚(GL)采用二甲基亚砜(DMSO)溶解,原始浓度为 12.5mmol/L;四唑氮蓝(MTT)用 0.01mol/L PBS 配制成 0.5%溶液;Hoechst 33258 荧光染料用去离子水配制成 0.5%溶液。以上试剂均购自 Sigma 公司,经过滤除菌,分装避光于 4^oC 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 PBMNCs 的分离 将正常献血白细胞层,用比重为 1.077 的淋巴细胞分离液分离,收集单个核细胞,RPMI 1640 培养液洗涤,调整细胞浓度培养。

1.2.2 GL 对细胞增殖的影响 采用 MTT 检测。浓度从 100 μmol/L 开始,以含同样梯度浓度 DMSO 的培养基为平行孔。将 HL-60、K562、U937、HFCL 以 3×10³/孔接种于 96 孔培养板中。24h 后按倍比稀释浓度梯度加入 GL。每 24h 加入 MTT 20 μl 培养 4h,离心吸去培养液,加入 150 μl DMSO 震荡 10min。酶联免疫检测仪检测吸光度(OD 值)。绘制生长曲线,计算半数抑制浓度(IC₅₀)值。对于 PBMNCs 接种密度为 1.2×10⁴/孔。

1.2.3 超微结构观察 将 20 μmol/L 的 GL 作用于对数生长期的 HL-60、K562、U937 细胞,24~36h 后收获细胞,PBS 洗涤,转移至 Eppendorf 管,1500rpm 离心 15min,4%戊二醛固定,包埋切片,电子显微镜观察。

1.2.4 细胞周期检测 20 μmol/L 的 GL 作用于上述白血病细胞,PBS 洗涤收获,70%冷乙醇固定。流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 Hoechst 33258 荧光染色 20 μmol/L 的 GL 作用于上述细胞,PBS 洗涤收获,涂片。加入 Hoechst 33258 荧光染料,37^oC 避光孵育 30min,荧光显微镜计数,以出现体积缩小、胞核固缩、染色质边

集或凋亡小体形成判断阳性细胞。

1.2.6 DNA 梯度电泳 将 GL 作用后的白血病细胞,PBS 洗涤收获,加裂解缓冲液,蛋白酶 K 56^oC 消化过夜,酚氯仿抽提,冷乙醇沉淀,TE 溶解。1.8%琼脂糖凝胶电泳,观察 DNA ladder^[4]。

2 结果

2.1 棉酚对细胞增殖的影响

结果提示 GL>6 μmol/L 时可明显抑制 HL-60、K562、U937 细胞的增殖,具有时间依赖效应。对于 PBMNCs 和 HFCL 细胞,当 GL>12 μmol/L 时,才表现出抑制增殖效应。

2.2 超微结构结果

电镜可见 GL 作用后,大量的细胞出现体积小、核固缩、染色质边集、凋亡小体形成等凋亡现象(图 1)。

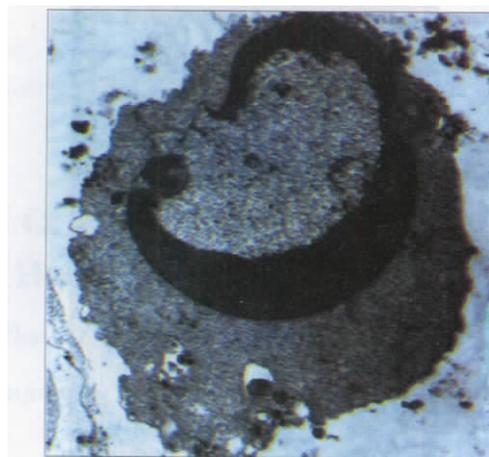


图 1 棉酚处理的白血病细胞出现染色质边集等凋亡现象 (K562 细胞)×8600

2.3 细胞周期结果

细胞周期提示 GL 作用后的细胞出现明显的亚 G₁ 凋亡峰。

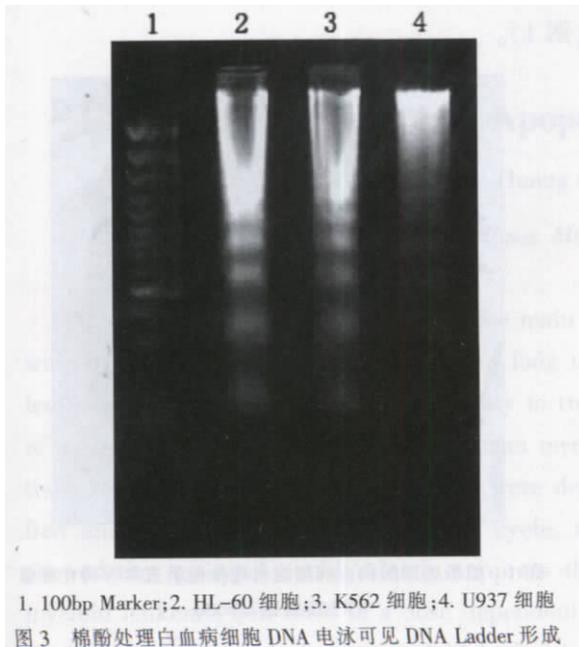
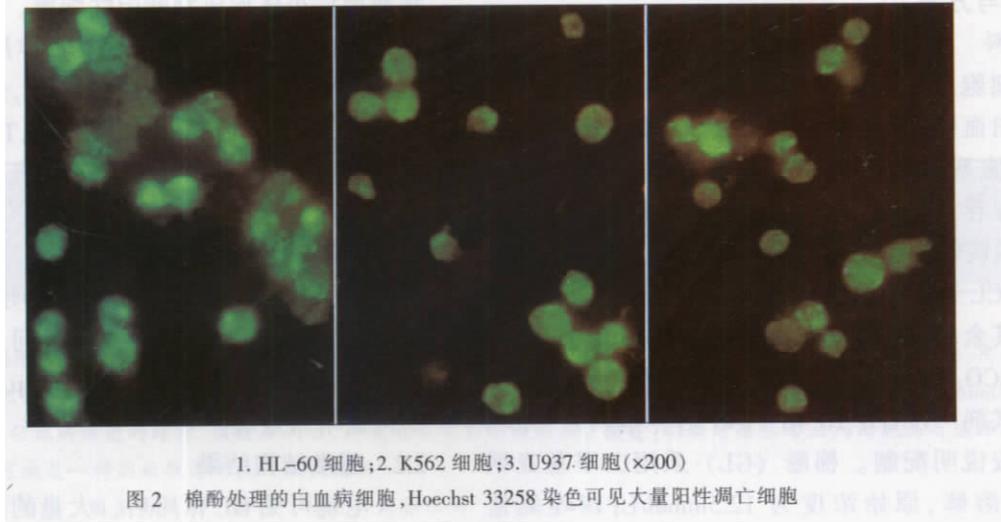
2.4 Hoechst 33258 荧光染色

GL 处理的上述细胞可见大量的染色阳性凋亡细胞(图 2)。

2.5 DNA 梯度电泳

抽提 GL 处理细胞 DNA 电泳,可见明显的 DNA Ladder 形成(图 4)。

2.6 经计算,GL 对 HL-60、K562、U937 细胞的 IC₅₀ 值分别为 10.01 μmol/L,12.46 μmol/L,14.67 μmol/L。而对于 PBMNCs 和 HFCL 细胞,则分别为 47.95 μmol/L,50.63 μmol/L。



3 讨论

研究表明,白血病与造血细胞增殖、分化失衡有关,表现为增殖失控、凋亡减少、分化受阻。许多药物可以促进白血病细胞凋亡与分化,这是其治疗白血病的主要机制^[5]。当前治疗白血病的药物如烷化剂等,毒副作用大,长期疗效欠佳。近来棉酚的抗实体瘤效应逐渐得到重视,有人用其治疗进展期的脑胶质细胞瘤和难治性肾上腺癌、乳腺癌等均取得了满意疗效^[3]。本研究表明,棉酚在 $>6 \mu\text{mol/L}$ 的浓度范围对3种经典髓系白血病细胞均表现出显著的抑制增殖、促进凋亡作用,而对于正常PBMNCs和HFCL细胞,其IC50值要显著高于白血病细胞,表明棉酚对白血病细胞具有广谱的选择杀伤效应。

与传统化疗药物相比,棉酚的副作用就显得相对简单。过去在用于节育治疗时,主要表现为低钾血

症、睾丸生精上皮损伤等,临床处理较容易。而且长期口服治疗剂量的棉酚不会引起骨髓抑制,相对其它白血病的化疗药物而言具有显著的优势^[6]。另外,其代谢产物氧化棉酚同样具有抗肿瘤作用。综上所述,棉酚可能是一种非常有前途的新型、高效低毒抗白血病药物^[7]。经过一系列研究之后,有望进入临床应用。

参考文献

- 1 Fanci R, Casini C, Leoni F, et al. Related Articles, Incidence and management of proven and probable funGLI infections in patients with acute leukemia: a single center experience [J]. J Chemother, 2004,16(6): 557-560
- 2 Bader P, Niemeyer C, Willasch A. Children with myelodysplastic syndrome and increasing mixed chimaerism after allogeneic stem cell transplantation have a poor outcome which can be improved by pre-emptive immunotherapy [J]. Br J Haematol, 2005,128(5): 649-658
- 3 Bushunow P, Reidenberg MM, Wasenko J, et al. Gossypol treatment of recurrent adult malignant gliomas[J]. J Neurooncol, 1999, 43(1): 79-86
- 4 Chen XQ, Wan YF, Bai QX, et al. Sodium Salicylate- Triggered Apoptosis in HL- 60 Cells Depends on Caspase- 8 Activation[J]. International Journal of Hematology, 2002,75(4):407-411
- 5 张永清,黄高昇,陈协群,等.HL- 60 细胞定向分化时 Bcl- 6 的表达 [J].中华血液学杂志,2004,25(9):569-571
- 6 Oliver CL, Miranda MB, ShanGLry S, et al. Gossypol acts directly on the mitochondria to overcome Bcl- 2- and Bcl- X (L)- mediated apoptosis resistance[J]. Mol Cancer Ther, 2005,4(1):23-31
- 7 Coutinho EM, Athayde C, Atta G. Gossypol blood levels and inhibition of spermatogenesis in men taking gossypol as a contraceptive. A multicenter, international, dose- finding study [J]. Contraception, 2000,61(1):61-67

(2006-03-10 收稿)

(赵连仲校对)