

人白血病 HL60 细胞的分化状态对细胞凋亡的影响

孟凡宏 何琪杨 池旭生* 周卫东 张鸿卿 薛绍白**

(北京师范大学生物系, 北京 100875; * 中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700)

摘要 用细胞培养和流式细胞术等方法, 研究人白血病 HL60 细胞诱导分化后, 对三尖杉酯碱(Har)和喜树碱(Cam) 诱导细胞凋亡的影响。结果表明, 12-豆蔻酰及 13-乙酸佛波酯以 $16 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度处理 HL60 细胞 24 h, 细胞向单核/巨噬细胞方向分化, 阻断于 G_1 期; 分化细胞抗 Har 和 Cam 诱导的细胞凋亡, 但其 c-myc 基因的表达无变化。1.4% 二甲基亚砷处理 HL60 细胞 48 h, 细胞向粒细胞方向分化, 阻断于 G_1 期; 分化细胞抗 Cam, 而不抗 Har 诱导的细胞凋亡; 分化细胞的 c-myc 基因表达明显下降。结果提示, 人白血病 HL60 细胞的分化状态, 明显影响三尖杉酯碱和喜树碱诱导的细胞凋亡, 但可能与 c-myc 基因的表达变化无关。

关键词 细胞分化; 细胞凋亡; 三尖杉酯碱; 人白血病 HL60 细胞; c-myc 基因

二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、12-豆蔻酰、13-乙酸佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)和维甲酸(retinoic acid, RA)可诱导人白血病 HL60 向单核/巨噬细胞、粒细胞方向分化^[1~3]。另外, HL60 细胞的分化状态影响对细胞凋亡的反应。PMA 诱导 HL60 细胞分化后, 分化细胞对拓扑异构酶 I 和 II 抑制剂诱导的细胞凋亡, 有明显的抗性; 而用 RA 诱导的分化细胞, 也有抗细胞凋亡的作用, 且随分化程度的加深, 抗性增加^[4]。DMSO 诱导 HL60 细胞分化后, 明显抑制喜树碱(camptothecin, Cam)诱导的凋亡^[5]。HL60 细胞被 1, 25-二羟基维生素 D_3 诱导分化后, 也抑制钙离子载体 A23187 诱导的细胞凋亡^[6]。因此, HL60 细胞被 PMA 和 DMSO 诱导分化后, 观察其对 Cam 和三尖杉酯碱(harringtonine, Har)诱导的细胞凋亡的影响, 有一定的理论意义。

材 料 和 方 法

药品 PMA 购自河南浙川制药厂, 用 DMSO 配成 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液。Cam 购自 Sigma 公司, 用 DMSO 溶解成 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 母液。Har 购自中国医学科学院协和药厂, 用 PBS 配成 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 母液。

细胞培养 人白血病 HL60 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640(GIBCO) 培养液中, 在 5% CO_2 , 37°C 的条件下培养, 所有实验的细胞均处于对数生长期。

流式细胞术 收集 1×10^6 细胞, 用预冷的 70% 酒精固定过夜, PBS 洗 3 次后, 经 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ RNase A 消化 30 min, 终浓度 $65 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的碘化丙锭(propidium iodide, PI)染色 1 h 后, 于 FACS420 型流式细胞仪测定。

染色质凝集观察 离心收集细胞, PBS 洗 1 次后用 Hoechst 33342($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 PI ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)双染 15 min, 紫外激发, 统计染色质凝集细胞的比例和 PI 阴性率, 每次计 200 个细胞, 实验重复 3 次。

RT-PCR 测定 c-myc 基因表达的变化 c-myc 基因的 RT-PCR 试剂盒由北京银利科技

本文于 1996 年 8 月 22 日收到。

本文为国家自然科学基金资助项目, 编号: 39380024

** 联系人

开发公司生物工程部惠赠, 实验操作按试剂盒说明进行。

细胞 DNA 提取 根据 Martin 的方法略有改动^[9]。10⁶ 个细胞加 200 μ l 细胞裂解液及蛋白酶 K(0.5 mg \cdot ml⁻¹), 50 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 加入 RNase A 使终浓度为 0.5 mg \cdot ml⁻¹, 50 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 加等体积的 TE 缓冲液, 用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)反复抽提 3 次, 水相用 2 倍体积的无水乙醇(-20 $^{\circ}$ C 预冷)和 0.2 体积的 10 mol \cdot L⁻¹的乙酸铵-20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜, 13000 \times g 离心 10 min, 空气干燥后用少量的 TE 溶解。1.2% 琼脂糖电泳, 紫外灯下检测并拍照。

结 果

1 分化细胞的形态变化

PMA 16 nmol \cdot L⁻¹处理 HL60 细胞 24 h, 细胞相互粘连成团, 拉长贴壁, 细胞向单核/巨噬细胞方向分化。1.4% DMSO 处理 HL60 细胞 48 h, 细胞体积缩小, 成梭形, 向粒细胞方向分化。

2 流式细胞术检测细胞凋亡

Cam 0.2 μ g \cdot ml⁻¹和 Har 0.1 μ g \cdot ml⁻¹作用 3 h, 诱导 HL60 细胞出现反映凋亡的典型“Apo”亚峰。PMA 诱导的分化细胞, 阻断于 G₁ 期, 其比例由对照的 29% 增加到 69%; 未被 Har 和 Cam 诱导出“Apo”亚峰。DMSO 诱导的分化细胞, G₁ 期的细胞比例由对照的 29% 增加到 62%, 未被 Cam 被 Har 诱导出“Apo”亚峰(图 1,2)。

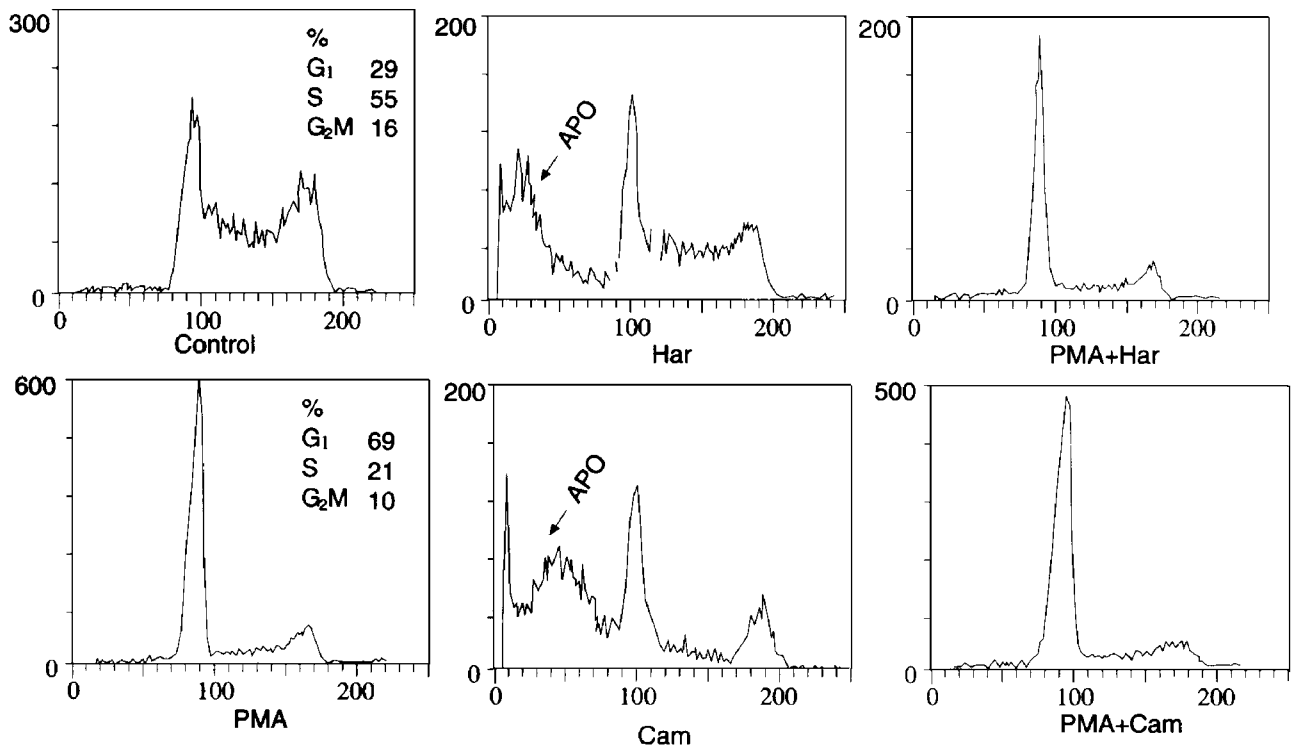


Fig 1 DNA histograms of HL60 cells and PMA-differentiated cells treated with Cam 0.2 μ g \cdot ml⁻¹ or Har 0.1 μ g \cdot ml⁻¹ for 3 h.

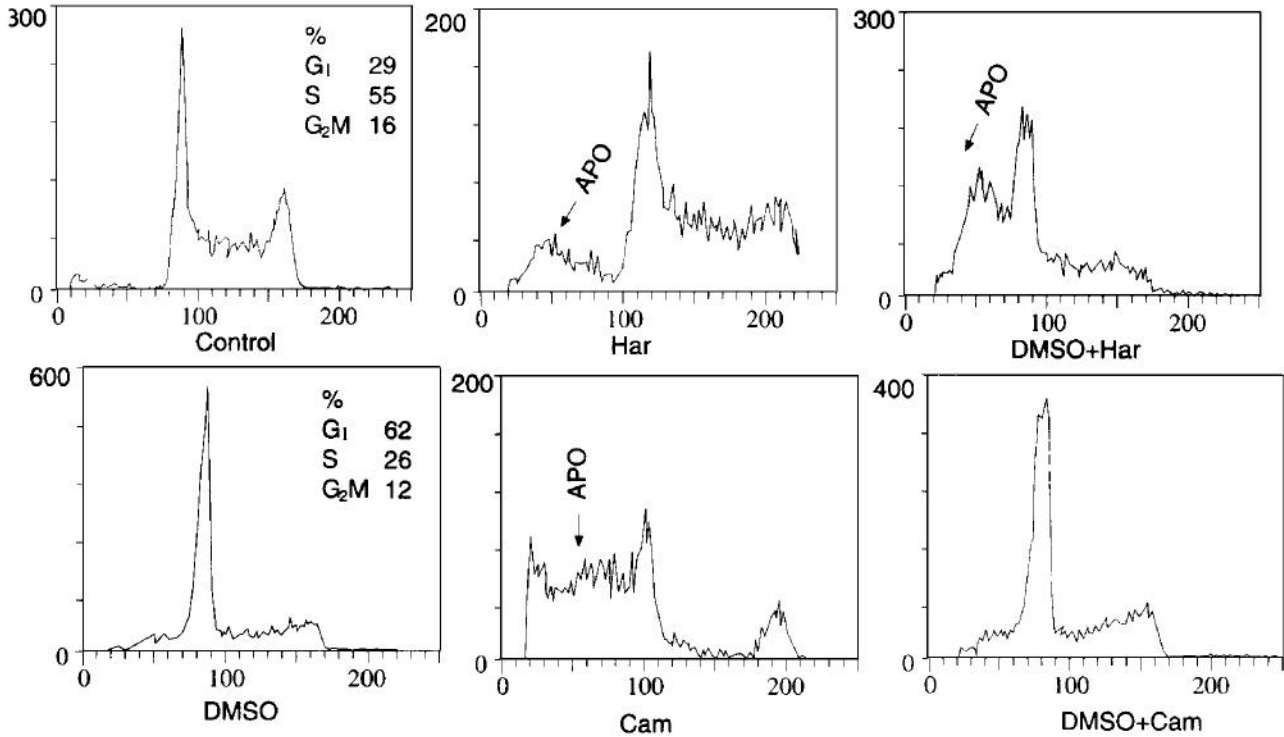


Fig 2 DNA histograms of HL60 cells and DMSO- differentiated cells treated with Cam $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ or Har $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for 3 h.

3 c-myc 基因表达的变化

反转录 PCR 测定结果表明, PMA 处理 HL60 细胞 24 h, 细胞中的 c-myc mRNA 表达水平基本无变化; 但 DMSO 处理 HL60 细胞 48 h, 细胞中的 c-myc mRNA 表达明显降低(图 3)。

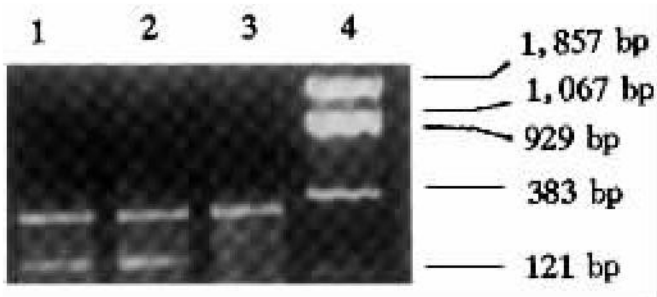


Fig 3 Expression of c-myc gene detected by RT-PCR. 1. HL60 cells: Control; 2. PMA $16 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h; 3. 1.4% DMSO for 48 h; 4. DNA Marker: pBR322/BstN I.

4 细胞染色质凝集变化

用 Cam $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 Har $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

处理 HL60 细胞, 出现大量的染色质凝集成“点状”的凋亡细胞, 用 Cam 和 Har 处理 PMA 诱导的分化细胞, 几乎观察不到凋亡的细胞。用 Har 处理 DMSO 诱导的分化细胞, 染色质凝集的细胞数, 与用 Har 处理未分化的细胞相似。用 Cam 处理 DMSO 诱导的分化细胞, 染色质凝集的细胞数, 与用 Cam 处理未分化的细胞相比, 染色质凝集的细胞数有明显减少。所有实验组的 PI 阴性率, 均大于 90%(图 4)。

5 细胞 DNA 电泳

Har $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 Cam $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 处理 HL60 细胞 3 h, 出现明显的 DNA“梯状”泳带。DMSO 诱导的分化细胞, 用 Cam 未诱导出 DNA“梯状”泳带, 而 Har 诱导的细胞仍有较明显的 DNA“梯状”泳带(图 5)。PMA 诱导的分化细胞, 用 Har 和 Cam 诱导, 不出现 DNA“梯状”泳带(结果未显示)。DNA 电泳的结果, 与流式细胞术和染色质凝集的结果相一致。

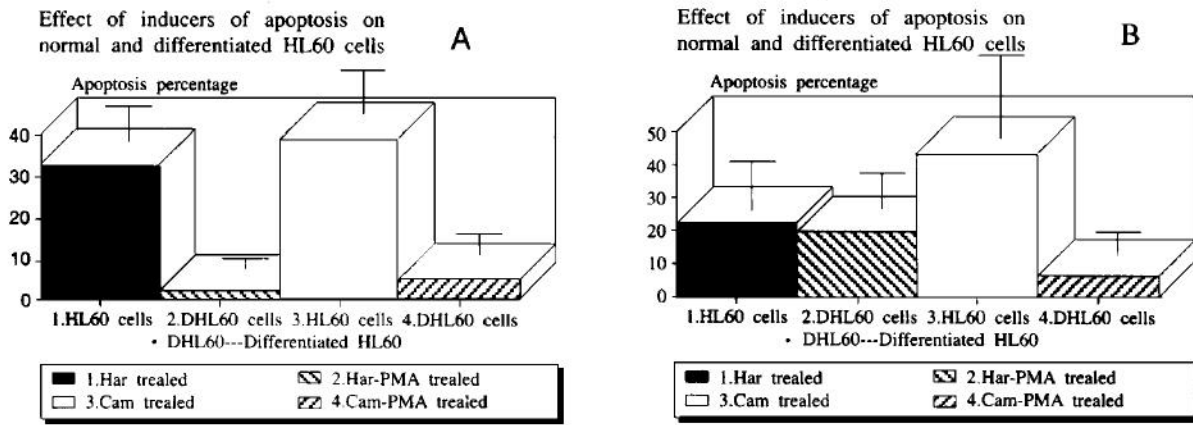


Fig 4 Percentage of apoptotic cells in HL60 cells, PMA-differentiated cells (A), and DMSO-differentiated cells (B), treated with Cam $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ or Har $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for 3 h.

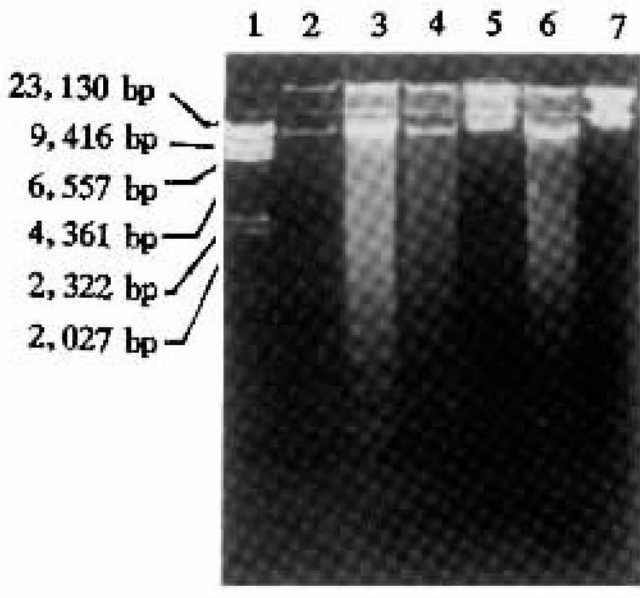


Fig 5 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from HL60 cells and DMSO-differentiated cells treated with Cam $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ or Har $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for 3 h. 1. DNA Marker $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$; 2. Control; 3. Har; 4. Har + DMSO; 5. Cam + DMSO; 6. Cam; 7. DMSO.

讨 论

本文的结果表明, HL60 细胞的分化状态, 明显影响对 Har 和 Cam 诱导的细胞凋亡的反应, 与许多文献报道^[4~6]相一致。HL60 分化细胞的抗细胞凋亡作用, 可能与下列的分子变

化有关: PMA 诱导 HL60 细胞分化为巨噬样细胞时, PKC 活性提高与细胞分化无关^[8], 由于 PKC 与细胞凋亡的关系密切^[9], 有可能 PKC 在分化细胞中介导抗细胞凋亡作用。酪氨酸蛋白激酶通路, 也有可能参与 HL60 分化细胞的抗细胞凋亡作用, RAS 是该通路的传递蛋白。HL60 分化细胞中, 酪氨酸蛋白激酶的活性提高^[10], 在 RA, PMA, DMSO 诱导 HL60 细胞分化时, RAS 蛋白含量提高^[11], RAS 通过调节核酸内切酶活性抑制细胞凋亡^[12]。

BCL-2 蛋白具有广泛的抗细胞凋亡的作用, 虽然转染 bcl-2 基因的 HL60 细胞, 被 RA 诱导分化成粒细胞时, 细胞存活时间延长^[13]; 但 HL60 细胞分化过程中, BCL-2 蛋白明显下降, 和抗细胞凋亡作用无关^[14,15]。c-myc 基因在 HL60 细胞分化过程中明显下降, 与细胞凋亡无关^[14]。本文的结果提示: DMSO 诱导的分化细胞, c-myc 的表达明显下降; 分化细胞只抗 Cam, 却不抗 Har 诱导的细胞凋亡。PMA 诱导的分化细胞, c-myc 的表达并不下降, 分化细胞明显抗 Har 和 Cam 诱导的细胞凋亡。结果表明, c-myc 的表达下降, 与分化细胞的抗细胞凋亡作用可能无关。

参 考 文 献

- 1 Rovera G, Santoli D, Damsky C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**:2779
- 2 Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, *et al.* Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethylsulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75**:2458
- 3 Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemic HL60 cell line by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**:2936
- 4 Solary E, Bertrand R, Kohn KW, *et al.* Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood*, 1993, **81**:1359
- 5 Bino GD, Li X, Traganos F, *et al.* Altered susceptibility of differentiating HL-60 cells to apoptosis induced by antitumor drugs. *Leukemia*, 1994, **8**:281
- 6 Xu HM, Tepper CG, Jones JB, *et al.* 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ protects HL60 cells against apoptosis but down-regulates the expression of bcl-2 gene. *Exp Cell Res*, 1993, **209**:367
- 7 Martin SJ. Protein or RNA synthesis inhibition induces apoptosis of mature human CD⁴⁺ T cell blasts. *Immunol Letters*, 1993, **35**:125
- 8 Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*, 1987, **70**:1233
- 9 Lucas M, Sanchez-Margalet V. Protein kinase C involvement in apoptosis. *Gen Pharmacol*, 1995, **26**:881
- 10 Frank DA, Sartorelli AC. Regulation of protein phosphotyrosine content by changes in tyrosine kinase and protein phosphotyrosine phosphatase activities during induced granulocytic and monocytic differentiation of HL-60 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, **140**:440
- 11 Kuliczowski K, Darley RL, Jacobs A, *et al.* Upregulation of p21 RAS levels in HL-60 cells during differentiation induction with DMSO, all- trans- retinoic acid and TPA. *Leukemia Res*, 1995, **19**:291
- 12 Arends MJ, McGregor AH, Toft NJ, *et al.* Susceptibility to apoptosis is differentially regulated by c-myc and mutated Haras oncogenes and is associated with endonuclease availability. *Br J Cancer*, 1993, **68**:1127
- 13 Park JR, Robertson K, Hickstein DD, *et al.* Dysregulated bcl-2 expression inhibits apoptosis but not differentiation of retinoic acid-induced HL-60 granulocytes. *Blood*, 1994, **84**:440
- 14 McCarthy JV, Fernandes RS, Gotter TG. Increased resistance to apoptosis associated with HL-60 myeloid differentiation status. *Anticancer Res*, 1994, **14**:2063
- 15 Terui Y, Furukawa Y, Sakoe K, *et al.* Expression of differentiation-related phenotypes and apoptosis are independently regulated during myeloid cell differentiation. *J Biochem*, 1995, **117**:77

EFFECTS OF DIFFERENTIATION STATUS ON APOPTOSIS OF HUMAN LEUKEMIA HL60 CELLS

FH Meng, QY He, XS Chi^{*}, WD Zhou, HQ Zhang and SB Xue

(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875;

** Institute of Basic Theory, Chinese Academy of Traditional Medicine, Beijing 100700)*

ABSTRACT The effects of differentiation of human leukemia HL60 cells on harringtonine(Har) and camptothecin(Cam)induced apoptosis(in these cells) were studied. When treated with phorbol 12-myriate, 13-acetate $16 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h, the HL60 cells differentiated into monocyte/macrophage cells and were arrested at G₁ phase. The differentiated cells were shown to be resistant to the Har and Cam induced apoptosis, but showed no change of expression of c-myc gene. HL60 cells incubated in 1.4% dimethyl sulfoxide for 48 h differentiated into granulocyte cells and were also gene arrested at G₁ phase. The differentiated cells became resistant to the apoptosis induced by Cam, but not that by Har, and expression of c-myc decreased drastically in the differentiated cells. The results indicate that the differentiated status of human leukemia HL60 cells apparently affected the apoptosis induced by harringtonine and camptothecin, but it was irrelevant to the change of the expression of c-myc gene.

KEY WORDS Cell differentiation; Apoptosis; Harringtonine; Human leukemia HL60 cell; c-myc gene