

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.010

2-甲氧基雌二醇逆转 K562/AO2 细胞耐药及其机制的初步研究

王晓宁,张梅

Mechanism of 2-methoxyestradiol Reversing Multidrug Resistance of K562/AO2 Cells

WANG Xiao-ning, ZHANG Mei

Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao tong University, Xi'an 710061, China

Abstract: Objective To investigate the possible mechanism of 2-methoxyestradiol reversing multidrug resistance of K562/AO2 cells. **Methods** The inhibitory effects of 2-methoxyestradiol on the proliferation of K562 and K562/AO2 cells were observed by MTT assay. Annexin V-FITC /PI staining was used to detect apoptosis. **Results** The resistance of K562/AO2 cells to ADR was 50 folds compared with K562 cells. The IC_{50} of ADR was evidently reduced by 2-methoxyestradiol. The reversal folds of 2-methoxyestradiol for K562/AO2 cells were 5.9. The result of Annexin-V /PI staining showed that rates of the apoptotic cells were 10.32%, 21.56% and 16.45% respectively, which were remarkably higher than that of control (6.68%). **Conclusion** 2-methoxyestradiol has reverse effect on K562/AO2 cells, its possible mechanism might be related with apoptosis of K562/AO2 cells.

Key words: 2-methoxyestradiol; K562/AO2 cells; Apoptosis

摘要:目的 研究 2-甲氧基雌二醇(2-ME)对 K562/AO2 细胞耐药性逆转作用及其可能机制。**方法** 利用不同浓度的 2-ME 作用于 K562 及 K562/AO2 细胞, MTT 法检测细胞对阿霉素的耐药性, 计算耐药倍数及逆转倍数; 利用 AnnexinV /PI 双染色法检测 K562/AO2 细胞的凋亡效应。**结果** 与 K562 细胞相比, K562/AO2 细胞的耐药倍数为 50 倍; 2-ME 可显著降低阿霉素对 K562/AO2 细胞的 IC_{50} , 逆转倍数为 5.9 倍。AnnexinV /PI 双染色法检测显示, 1、4、16 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-ME 处理 K562/AO2 细胞后细胞凋亡率分别为 10.32%、21.56% 和 16.45%, 而对照组凋亡率仅为 6.68%。**结论** 2-ME 能够逆转 K562/AO2 阿霉素耐药, 其机制可能与诱导 K562/AO2 细胞凋亡有关。

关键词: 2-甲氧基雌二醇; K562/AO2 细胞; 细胞凋亡**中图分类号:** R733.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)11-1257-03

0 引言

2-甲氧基雌二醇(2-methoxyestradiol, 2-ME)是 17 β -雌二醇在体内的生理代谢产物, 具有诱导肿瘤细胞凋亡和分化、抗肿瘤血管新生等作用。已有研究显示 2-ME 对人慢性粒细胞白血病急性红白血病细胞株 K562 细胞有诱导凋亡作用, 但是 2-ME 是否能够逆转阿霉素耐药的细胞株 K562/AO2 细胞耐药及其机制目前尚不清楚。本实验以耐阿霉素的 K562 细胞为研究对象, 探讨 2-ME 逆转 K562/AO2 细胞阿霉素耐药作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

2-ME 购自 Sigma 公司, 阿霉素(ADR)购自浙江海正药业公司, 标准胎牛血清购自杭州四季青公司, RPMI1640 购自 Gibco 公司, Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Becton Dickinson 公司。

1.2 细胞株及培养

K562 及 K562/AO2 细胞均用 RPMI1640 培养液(含 10% 小牛血清、链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$ 及青霉素 100 u/ml), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100%湿度培养箱中培养。其中 K562/AO2 细胞在培养过程中加用 1 $\mu\text{g/ml}$ 阿霉素维持耐药性, 实验前 2 周在无阿霉素的培养液中培养。所有实验均取对数生长期细胞进行。

1.3 方法

1.3.1 MTT 法检测 2-ME 对 K562/AO2 细胞生长的影响

收稿日期: 2010-12-22; 修回日期: 2011-05-18

基金项目: 西安交通大学医学院第一附属医院院基金资助项目(2007-YK-10)

作者单位: 710061 西安, 西安交通大学医学院第一附属医院血液科

作者简介: 王晓宁(1982-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事恶性血液病的基础及临床研究

取对数生长期的 K562/AO2 细胞,调细胞终浓度为 $2 \times 10^5/L$,按每孔 200 μl 接种于 96 孔板,加入 2-ME 的浓度分别为 0.5、1、2、4、8、16 $\mu mol/L$,在 37 $^{\circ}C$,5% CO_2 培养箱中孵育 24、48 和 72 h 后,加入 MTT 20 μl ,继续孵育 4 h,离心弃上清液,每孔加入二甲亚砜(DMSO) 200 μl ,置振荡器上振荡 5 min,用酶标仪测定 570 nm 波长的吸收值 A。计算 2-ME 的 IC_{50} 及 IC_{10} 。

1.3.2 药物逆转试验

对数生长期细胞调整为 $2 \times 10^5/L$,按每孔 200 μl 置于 96 孔板中,在 37 $^{\circ}C$,5% CO_2 孵育 24 h,离心去上清液,加入 6 种倍增质量浓度的阿霉素(ADR)(K562/AO2:ADR 终质量浓度为 0.78、1.562、3.125、6.25、12.5、25 mg/L;K562:ADR 终质量浓度为 0.195、0.39、0.78、1.562、3.125、6.25 mg/L),加入或不加入 2-ME(IC_{10}),并用异搏定 10 $\mu mol/L$ 作为阳性对照,在 37 $^{\circ}C$,5% CO_2 孵育 72 h,加入 MTT 20 μl ,继续孵育 4h,离心弃上清液,每孔加入 DMSO 200 μl 置振荡器上振荡 5 min,于酶标仪测定吸收值 A。实验重复 3 次,计算 K562/AO2、K562 的 ADR IC_{50} ,并进一步求出耐药倍数与逆转倍数。耐药倍数 = 耐药细胞 IC_{50} /敏感细胞 IC_{50} ; 逆转倍数 = 不加逆转剂的 IC_{50} /加逆转剂的 IC_{50} 。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

取对数生长期的 K562/AO2 调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/ml$,不加或加入 1、4、16 $\mu mol/L$ 的 2-ME。置 37 $^{\circ}C$,5% CO_2 培养箱内孵育 72 h,收集细胞,用预冷的 $1 \times PBS$ 洗 2 次,每管用 $1 \times binding\ buffer$ 把细胞浓度调整成 $1 \times 10^6/ml$,每管取 100 μl 加入 5 μl 的 AnnexinV-FITC 溶液进行染色,轻轻混匀,再加入 5 μl 的 PI 溶液染色,双染后在室温下避光静止 15 min 后每管再加入 $1 \times binding\ buffer$ 400 μl ,在 1 h 内上流式细胞仪进行凋亡检测。凋亡细胞呈 AnnexinV/FITC+、PI+; 坏死细胞呈 AnnexinV/FITC-、PI+; 活细胞呈 AnnexinV/FITC-、PI-。每份标本设一个重复管,重复 1 次,计算凋亡细胞的百分数。

1.4 统计学方法

采用统计软件 SPSS13.0 对实验数据进行分析。组间分析采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2-ME 对 K562/AO2 细胞生长的影响

检测结果显示,2-ME 能够抑制 K562/AO2 细

胞的增殖,呈浓度及时间依赖性,但至 16 $\mu mol/L$ 时细胞抑制率反而增加不明显,2-ME 的 IC_{50} 为 3.7 $\mu mol/L$, IC_{10} 为 0.2 $\mu mol/L$,见图 1。

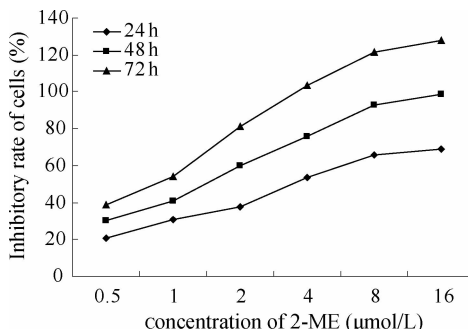


图 1 不同浓度 2-ME 对 K562/AO2 细胞作用 24、48、72 h 时的生长抑制的影响

Figure 1 Growth inhibition effect of different concentrations of 2-ME on K562/AO2 cells at 24, 48 and 72 hours

2.2 药物逆转试验结果

K562/AO2、K562 的 ADR IC_{50} 分别为 28.10 mg/L、0.56 mg/L,K562 细胞阿霉素耐药倍数约为 50 倍,逆转倍数 = 不加逆转剂的 IC_{50} /加逆转剂的 $IC_{50} = 28.1/4.74 = 5.9$,见表 1、2。

表 1 不同浓度 ADR 时 2-ME 对 K562 细胞生长的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The influence of 2-ME on K562 cells growth with different concentration of ADR($\bar{x} \pm s$)

Groups	-2-ME Absorbance (A)	+2-ME Absorbance (A)
Control	0.68 ± 0.06	0.98 ± 0.07
ADR		
0.195	0.48 ± 0.06	0.62 ± 0.09
0.39	0.36 ± 0.02	0.50 ± 0.08
0.78	0.30 ± 0.04	0.44 ± 0.06
1.562	0.23 ± 0.02	0.30 ± 0.04
3.125	0.15 ± 0.03	0.23 ± 0.03
6.25	0.10 ± 0.01	0.19 ± 0.03

Note: compared with control group, $P < 0.05$

表 2 不同浓度 ADR 时 2-ME 对 K562/AO2 细胞生长的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The influence of 2-ME on K562/AO2 cells growth with different concentrations of ADR($\bar{x} \pm s$)

Groups	-2-ME Absorbance (A)	+2-ME Absorbance (A)
Control	1.39 ± 0.09	1.02 ± 0.10
ADR		
0.78	1.24 ± 0.06	0.82 ± 0.09
1.562	1.12 ± 0.05	0.69 ± 0.04
3.125	1.08 ± 0.07	0.56 ± 0.03
6.25	0.92 ± 0.03	0.44 ± 0.02
12.5	0.82 ± 0.04	0.38 ± 0.03
25	0.76 ± 0.02	0.30 ± 0.01

Note: compared with control group, $P < 0.05$

2.3 2-ME 对 K562/AO2 细胞凋亡率的影响

K562/AO2 细胞经 1、4、16 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-ME 作用 72 h 后流式细胞仪检测凋亡率。结果显示在一定浓度范围内 (1~4 $\mu\text{mol/L}$) 2-ME 诱导 K562/AO2 细胞凋亡的作用随浓度的增加而增强, 具有浓度依赖性, 但当 2-ME 浓度继续增加至 16 $\mu\text{mol/L}$ 时诱导凋亡作用反而减弱, 见表 3。

表 3 不同浓度 2-ME 诱导 K562/AO2 细胞的凋亡率(%, $\bar{x} \pm s$)
Table 3 Apoptosis of K562/AO2 cells treated with different concentrations of 2-ME(%, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Apoptosis rate(%)
K562/AO2	6.68 \pm 0.16
K562/AO2 + 2-ME(1 $\mu\text{mol/L}$)	10.32 \pm 0.28
K562/AO2 + 2-ME(4 $\mu\text{mol/L}$)	21.56 \pm 1.32
K562/AO2 + 2-ME(16 $\mu\text{mol/L}$)	16.45 \pm 1.56

3 讨论

2-甲氧基雌二醇作为一种雌二醇在体内的生理代谢产物, 近年来研究显示在体内外对于骨肉瘤、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、直肠癌、胰腺癌等多种肿瘤均显示了良好的抗肿瘤活性, 而且治疗剂量下未引起动物骨髓粒细胞减少。目前已有研究显示 2-ME 在一定的浓度和作用时间范围内, 呈剂量-时间依赖形式抑制人慢性粒细胞白血病急性红白血病变细胞株 K562 细胞生长, 其机制可能是 2-ME 通过升高 bax/bcl-2 比值降低线粒体膜电位、促使细胞色素 C 释放入胞质、触发 K562 细胞的线粒体凋亡途径, 活化 Caspase-3, 导致 K562 细胞凋亡并抑制其增殖; 通过下调 bcr/ablmRNA 表达以阻断 PI3K/Akt 信号通路、抑制 SOD 及增加 ROS 水平等途径也参与了 K562 细胞凋亡过程^[1-4], 但当 2-ME 浓度至 16 $\mu\text{mol/L}$ 时, K562 细胞出现坏死, 可能是由于较高浓度的 2-ME 产生细胞毒作用而直接杀死细胞所致, 与 2-ME 抑制骨髓瘤、前列腺癌细胞等的结果基本一致。另有研究指出, 2-ME 只对增生活跃的细胞有作用, 而对静止的、不分裂的细胞无作用, 因此为 2-ME 的临床应用提供了实验基础。K562/AO2

细胞株是耐阿霉素的 K562 细胞株, 研究发现麻黄碱、姜黄素、红霉素等能够逆转其多药耐药性。主要是通过诱导 K562/AO2 细胞凋亡及下调 K562/AO2 细胞膜糖蛋白 P170 的表达逆转其耐药性^[5-6]。

本研究通过 MTT 法检测 2-ME 对 K562/AO2 细胞增殖活性的影响, 结果显示随着时间的延长, 2-ME 在一定浓度范围内, 能够抑制 K562/AO2 细胞增殖, 呈浓度时间依赖性, 但是 2-ME 浓度至 16 $\mu\text{mol/L}$ 时, K562/AO2 细胞抑制率并未明显增加, 这与 2-ME 对 K562 细胞的作用相似, 可能与直接细胞毒性有关。进一步通过药物逆转试验发现, 2-ME 能够逆转 K562/AO2 细胞阿霉素耐药。为了进一步探讨 2-ME 逆转 K562/AO2 细胞阿霉素耐药的机制, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡率, 显示 2-ME 能够诱导 K562/AO2 细胞凋亡, 提示逆转耐药机制可能与诱导细胞凋亡有关。是否有其他的机制参与尚需进一步试验证实。

综上所述, 2-ME 能够逆转 K562/AO2 细胞对阿霉素的抗药性, 与诱导 K562/AO2 细胞凋亡有关, 但详细的逆转耐药机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 李栋梁, 潘陵. 2-甲氧基雌二醇对白血病细胞 K562 增生、凋亡及细胞周期的影响[J]. 白血病·淋巴瘤, 2007, 16(1): 26-29.
- [2] 李栋梁, 张静, 张文君, 等. 2-甲氧基雌二醇对慢性髓系白血病 K562 细胞 Caspase-3 及 Survivin 表达的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(2): 335-339.
- [3] 张学亚, 战榕, 黄豪博, 等. 2-甲氧基雌二醇诱导 K562 细胞凋亡及其机制的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(2): 340-344.
- [4] 张苏伟, 张俏忻, 吴映娥, 等. 二甲氧雌二醇对白血病细胞 K562 增殖、凋亡的作用及机制[J]. 中国药师, 2010, 13(2): 169-173.
- [5] 常宏宇, 潘凯丽, 马福成, 等. 姜黄素、红霉素逆转 K562/AO2 细胞多药耐药机制的研究[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(4): 254-259.
- [6] 茆俊卿, 张育, 顾健, 等. 麻黄碱逆转 K562/AO2 细胞多药耐药性的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(2): 156-159.

[编辑: 安 凤; 校对: 周永红]