

三氧化二砷对非 M₃ 的 AML 及 ALL 细胞 Fas 和 FasL 蛋白影响的研究

龙怡, 杜欣, 翁建宇, 林伟

Effect of Arsenic Trioxide on Fas/FasL in Human Non-M₃ AML and ALL Cell Lines

LONG Yi, DU Xin, WENG Jian-yu, LIN Wei

Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510180, China

Abstract: Objective To investigate the effect of As₂O₃ on Fas/FasL in human non-M₃ AML and ALL cells.

Methods We cultured non-M₃ AML and ALL cells with different dose As₂O₃ together in vitro. The effect on cells in vivo and growth were evaluated according to cell count in vivo and determination of cell viability. Meanwhile flow cytometry was used to detect the change of DNA, Fas and FasL. **Results** As the dose of As₂O₃ increased from 0 μmol/L to 2 μmol/L, the rates of inhibition of non-M₃ AML and ALL cell growth increased from (10.6 ± 1.6) % to (29.36 ± 2.6) %. Meanwhile the rate of apoptosis increased from (0.07 ± 2.5) % to (5.04 ± 2.2) %. Fas, FasL expressed as: [(21.63 ± 10.52) % and (19.39 ± 8.93) %] (0 μmol/L As₂O₃ group), [(32.67 ± 16.35) % and (25.67 ± 8.10) %] (1 μmol/L As₂O₃ group), [(44.09 ± 21.23) % and (36.64 ± 11.50) %] (2 μmol/L As₂O₃ group). **Conclusion** As₂O₃ can inhibit and affect cell cycle growth of non-M₃ AML and ALL cells dose-dependently. As₂O₃ can induce non-M₃ AML and ALL cells to apoptosis as well as up-regulate expression of Fas, FasL in those cells indicating Fas/FasL system may be related to As₂O₃ induced apoptosis.

Keywords: Arsenic trioxide; Apoptosis; Fas; FasL; Non-M₃ AML and ALL

摘要:目的 了解 As₂O₃ 对非 M₃ 的急性髓性白血病 (AML) 及急性淋巴细胞性白血病 (ALL) 细胞 Fas、FasL 蛋白的影响。**方法** 将非 M₃ 的 AML 细胞和 ALL 细胞体外与不同浓度 As₂O₃ 共同培养, 通过细胞计数、细胞活力的判定并利用流式细胞仪检测 DNA、Fas 和 FasL 蛋白的变化, 来观察 As₂O₃ 对上述细胞的细胞活力、增殖周期及 Fas、FasL 蛋白的影响。**结果** 随着 As₂O₃ 浓度由 0 μmol/L 增加至 2 μmol/L, 细胞活力由 (91.1 ± 2.3) % 降至 (64.32 ± 3.5) %; 细胞生长抑制率由 (10.6 ± 1.6) % 增至 (29.36 ± 2.6) %; 细胞凋亡率由 (0.07 ± 2.5) % 增至 (5.04 ± 2.2) %; 随着 As₂O₃ 浓度增加, Fas、FasL 的阳性率也随之增加。**结论** As₂O₃ 以浓度依赖的方式抑制非 M₃ 的 AML 及 ALL 细胞的生长、活力及细胞周期, 使 G₀-G₁ 期细胞增多, As₂O₃ 在诱导非 M₃ 的 AML 及 ALL 细胞发生凋亡的同时, 可以上调 Fas、FasL 的表达, 提示 Fas/FasL 系统可能参与了 As₂O₃ 诱导的非 M₃ 的 AML 及 ALL 细胞的凋亡。

关键词: 三氧化二砷; 凋亡; Fas; FasL; 非 M₃ 的 AML 及 ALL

中图分类号: R733.71 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)06-0336-02

0 引言

目前, 三氧化二砷 (As₂O₃) 治疗急性早幼粒细胞白血病 (APL) 以外的肿瘤如多发性骨髓瘤^[1], 骨髓增生异常综合征^[2] 等取得了一定的疗效, 但确切的机制尚不明了。已知 As₂O₃ 介导细胞凋亡的机制呈现多因素及细胞特异性的特征。本文为进一步探索 As₂O₃ 诱导细胞凋亡的机制, 初步探讨了 As₂O₃ 对非 M₃ 的 AML 及 ALL 细胞 Fas 和 FasL 蛋白的影响, 为临床进一步应用 As₂O₃ 治疗非 M₃ 的 AML 及 ALL 患者, 提供实验依据。

1 资料和方法

1.1 资料

1.1.1 病例来源 2003 年 5 月至 8 月间, 我院收治的急性白血病患者共 8 例, 其中男性 6 例, 女性 2 例, 年龄 6 ~ 60 岁, 中位年龄 38 岁。急性白血病诊断标准参照张之南主编《血液病诊断及疗效标准》第 2 版, 其中 ALL 4 例, AML 4 例; 4 例 ALL 中 3 例为初诊, 1 例为复发病例; 4 例 AML 病人均为复发病例, 2 例为 M₁, 2 例为 M_{2a}。

1.1.2 标本采集及有关试剂 无菌条件下自病人髂后 (前) 上棘抽取 3 ~ 5 ml 骨髓液, 置无菌试管中经 100 U/ml 肝素抗凝, 2 h 内完成骨髓细胞的分离。(1) As₂O₃ 液: 由哈尔滨依达药业公司惠赠, 1 mg/L。用 NS 稀释至浓度为 1 mmol/L 保存, 实验时稀释至

收稿日期: 2004-02-17; 修回日期: 2004-04-14

基金项目: 广东省中医药局科研基金资助项目 (102096)

作者单位: 510080 广州, 广东省人民医院血液科

所需的工作浓度。(2)鼠抗人 Fas 单抗,鼠抗人 FasL 单抗,羊抗鼠二抗 IgM。RD 公司产品。(3)PI 染液:碘化丙锭,Sigma 公司产品。(4)RNaseA:Sigma 公司产品。(5)穿透固定液:70% 酒精。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞分离及培养 骨髓经淋巴细胞分离液分离出单个核细胞,以 $2 \times 10^5/ml$ 浓度置于 RPMI 1640 培养液(含 20% 胎牛血清、双抗青霉素 100U/L、链霉素 100U/L),加入不同浓度 As_2O_3 ,在 37℃、5%CO₂ 培养箱内培养。

1.2.2 流式细胞仪

(1)白血病细胞分子标志检测:试管中加入相应的荧光 McAb,每种 McAb 各 5μl。将上述方法收集的细胞 1×10^4 置各个试管中,混匀,放置避光处室温孵育 20min,1000 ~ 1200rpm 离心 5min,弃上清液。加入 PBS2ml 悬浮细胞,800 ~ 1000rpm 离心 5min,弃上清液。悬浮细胞加入固定液 450μl 混匀,放置 2 ~ 8 避光处,待上机分析。用 CellQuest 软件分析结果。

(2)DNA 含量分析:取待测细胞 1×10^4 ,加入 PBS 缓冲液 2ml,800rpm,10min,弃上清液,悬浮细胞,加入体积分数 70% 的乙醇 2ml 固定 24h。1200rpm 离心 10min,弃上清液,悬浮细胞。随后以 PBS 清洗,加入 0.5% RNaseA50 μl 混匀,放置 30min。加入 450μlPI 溶液,放置 2 ~ 8 避光处 30min,上机待测。用 ModFit 软件分析 DNA 数据。

(3)Fas,FasL 检测: 1×10^6 细胞用 1mlPBS 混匀,加入设门所需单抗,以及鼠抗人 Fas,FasL 单抗 20μl,4 30min,PBS 洗 2 次,加 FITC-抗鼠 IgM 20μl,4 30min,PBS 清洗后以 PBS 0.5ml 悬浮细胞,进行 FCM 检测。以 FITC 标记的无关单抗作阴性对照。

1.3 统计学处理

在 SPSS10.0forwindow 统计软件支持下进行,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 LSD *t* 检验。

2 结果

2.1 As_2O_3 抑制非 M₃ 的急性白血病细胞的活力

非 M₃ 的急性白血病细胞与不同浓度的 As_2O_3 共同培养 24h 后判断细胞的活力。对照组为不加药组,实验组分为 1μmol/L 及 2μmol/L 组。随着 As_2O_3 浓度的增加,细胞活力下降,细胞生长抑制率增加,表明 As_2O_3 对非 M₃ 的 AML 及 ALL 细胞均可影响细胞的活力和增殖,并呈浓度依赖。

表 1As As_2O_3 对非 M₃ 的急性白血病细胞生长活力的影响(%)

观察项目	对照组	1μmol/L As_2O_3 组	2μmol/L As_2O_3 组
细胞活力	91.1 ±2.3	81.5 ±2.0	64.38 ±3.5
生长抑制率		10.6 ±1.6	29.36 ±2.6

2.2 As_2O_3 对非 M₃ 的急性白血病细胞细胞周期的影响

实验发现,1μmol/L As_2O_3 组和 2μmol/L As_2O_3 组的 G₀ ~ G₁ 期细胞较 0μmol/L As_2O_3 组增多,提示 As_2O_3 可影响非 M₃ 的 AML 和 ALL 细胞的细胞周期。另外,0μmol/L As_2O_3 组的凋亡率较用药前轻度增加,结果见表 2。

表 2As As_2O_3 作用后各期细胞百分率及凋亡率的变化(%)

	用药前	0μmol/L As_2O_3	1μmol/L As_2O_3	2μmol/L As_2O_3
G ₀ -G ₁ 期细胞	87.09 ±1.6	86.97 ±2.3	89.69 ±1.8	90.85 ±2.4
G ₂ /M 期细胞	3.99 ±2.7	5.16 ±1.8	4.34 ±2.0	3.45 ±2.1
凋亡率	0.07 ±2.5	1.85 ±2.1	2.04 ±2.6	5.04 ±2.2

* 用药前组为未经培养、未经加药的新鲜骨髓细胞组

2.3 As_2O_3 对非 M₃ 的 AML 和 ALL 细胞 Fas, FasL 蛋白的影响,见表 3。

表 3As As_2O_3 作用下非 M₃ 的 AML 和 ALL 细胞 Fas 的表达

组 别	Fas/FasL 阳性率 %	P(Fas/FasL)
用药前组	(15.93 ±5.98) / (11.13 ±4.64)	
0μmol/L	(21.63 ±10.52) / (19.39 ±8.93)	P ₁ = 0.445/0.066
1μmol/L	(32.67 ±16.35) / (25.67 ±8.10)	P ₂ = 0.031/0.002
2μmol/L	(44.09 ±21.23) / (36.64 ±11.50)	P ₃ = 0.001/0.000

注:Fas 表达值 F=5.743, P=0.003;FasL 表达值 F=12.441, P=0.000。P₁ 为 0μmol/L As_2O_3 组与用药前组比较, P₂ 为 1μmol/L As_2O_3 组与用药前组比较, P₃ 为 2μmol/L As_2O_3 组与用药前组比较

3 讨论

以往的研究证实砷剂治疗白血病的重要机制之一是诱导肿瘤细胞发生凋亡,本实验的结果也显示 As_2O_3 可以抑制非 M₃ 的 AML 和 ALL 细胞的活力,并发现随着 As_2O_3 浓度的增加,凋亡细胞明显增加,表明 As_2O_3 可以诱导非 M₃ 的 AML 和 ALL 细胞发生凋亡,并且呈浓度依赖。

Fas/FasL 信号传导途径是一独特的凋亡途径。通过 Fas 途径诱导免疫细胞凋亡,从而产生免疫逃

(下转第 350 页)

3.3 PDGF 在肿瘤生成的可能作用及临床意义

PDGF 是否在肿瘤的发生及发展起重要的作用,是值得关注的另一个问题。近年来,血管生成在肿瘤的发生、发展和转移过程中发挥着重要作用。PDGF 作为一个血管因子,毫无疑问与肿瘤的发生有密切关系。我们的研究结果亦证实了 PDGF 能促进体外白血病肿瘤细胞的生长增殖,并上调肿瘤生长基因 *c-fos*。PDGF- 受体在该肿瘤细胞得到证实,为临床应用 ST1571 治疗白血病提供了有价值的线索。酪氨酸激酶抑制剂 ST1571 (Gleevec, 格列卫)就是通过作用 PDGF- 受体,抑制细胞的酪氨酸激酶磷酸化,从而对肿瘤细胞起治疗作用^[7]。

因此我们认为血小板源性生长因子 PDGF 和其受体可能在白血病等肿瘤的发生发展及临床治疗上有重要的价值。研究也支持了我们的假设:血小板的功能不仅是参与止血和血栓形成,而且在肿瘤的发生发展也扮演着一个重要的角色。

参考文献:

- [1] Yang M, Khachi gian LM, Hicks C, et al. Identification of PDGF receptor on human megakaryocytes and megakaryocytic cell lines

- [J]. *Thromb Haemost*, 1997, 78 (2): 892-896.
- [2] Yang M, Li K, Lam A C, et al. PDGF enhances granulopoiesis via bone marrow stromal cells [J]. *Int J Hematol*, 2001, 73 (3): 327-334.
- [3] Yang M, Chesterman C N, Chong B H. Recombinant PDGF enhances megakaryocytopoieses in vitro [J]. *Br J Haematol*, 1995, 91 (2): 285-289.
- [4] Chui C M, Li K, Yan g M, et al. Platelet -derived growth factor up-regulates the expression of transcription factors NF- κ B, GATA-1 and c-fos in megakaryocytic cell lines [J]. *Cytokine*, 2003, 21 (2): 51-64.
- [5] Su R J, Li K, Yan g M, et al. Platelet -derived growth factor enhances ex vivo expansion of megakaryocytic progenitors from human cord blood [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2001, 27 (10): 1075-1080.
- [6] Su R J, Li K, Yan g M, et al. Platelet -derived growth factor promotes ex vivo expansion of CD34⁺ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient reconstituted populations and formation of adherent cells [J]. *Br J Haematol*, 2002, 117 (3): 735-746.
- [7] Hwang R F, Yokoi K, Bucana C D, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by ST1571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (17): 6534-6544.

[编辑: 张麟; 校对: 周永红]

(上接第 337 页)

逸,与肿瘤的发生、发展、耐药、复发等有密切的关系。Fas 在造血系统多种肿瘤细胞上表达,如:B 细胞性白血病细胞、多发性骨髓瘤细胞、成人 T 细胞白血病细胞、毛细胞白血病细胞和急性髓性白血病细胞。但 Fas 阳性的细胞并非都对 Fas 介导的凋亡敏感。有研究表明在急性白血病无论 (AML) 或 ALL, Fas 受体表达的量低于正常的血液细胞,白血病细胞从基因水平下调 Fas 分子的表达^[3]。我们的实验也发现未经治疗的急性白血病细胞表达 Fas, 但与正常细胞的表达水平有明显的差异,提示白血病细胞 Fas 的表达存在质和量的异常,从而逃避机体 Fas/FasL 系统的监控,细胞凋亡受抑制,使得白血病细胞可以大量存在并不断增殖。如果使肿瘤细胞的 Fas 表达上调,可恢复肿瘤细胞对 Fas/FasL 介导的凋亡的敏感性。已有研究发现在实体瘤如胰腺癌细胞, As₂O₃ 可诱导其凋亡,并出现 Fas、Fas-L 蛋白的表达增加^[4]。本实验的结果初步显示 As₂O₃ 可以一定程度上调急性白血病细胞 Fas 的表达,并呈浓度依赖的方式。

本研究结果显示,非 M₃ 的急性白血病细胞 FasL 表达率达 11.13 ± 4.46%,进一步的观察发现,体外加入 As₂O₃ 培养后,随着 As₂O₃ 浓度增加,凋亡细胞增多的同时, FasL 的表达也呈现增多的趋势,且依赖 As₂O₃ 的浓度,提示 FasL 有可能参与了 As₂O₃ 诱导的非 M₃ 急性白血病细胞的凋亡过程。

参考文献:

- [1] NCMunshi, GTricot, RDesikan, et al. Clinical activity of arsenic trioxide for the treatment of multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2002, 16: 1835-1837.
- [2] Chenson B D, Bennett J M, Kantar jian H, et al. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2000, 96 (9): 3671-3674.
- [3] Munker R, Lubbert M, Yonehara S, et al. Expression of the Fas antigen on primary human leukemia cells [J]. *Ann Hematol*, 1995, 70: 15-17.
- [4] 张兴荣, 蔡洪培, 邓志华, 等. 氧化砷诱导胰腺癌细胞凋亡与 Fas、Fas-L 关系的研究 [J]. *解放军医学杂志*, 1999, 24 (6): 450-452.

[编辑: 张麟; 校对: 安凤]