

· 药物研究 ·

全反式维甲酸对 急性前髓性白血病细胞 HL60 生长的影响*

金源, 邓豫, 王桂华, 李小兰, 龚建平, 胡俊波

(华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤研究所/胃肠外科, 武汉 430030)

摘要 **目的** 观察全反式维甲酸(ATRA)对急性前髓性白血病细胞 HL60 生长的影响,探讨其抑制肿瘤生长的作用方式。**方法** 建立急性前髓性白血病细胞 HL60 的裸鼠皮下实体瘤模型,经尾静脉隔日给予 ATRA,第 14 天测量肿瘤大小;体外实验中,用免疫荧光法检测分化相关抗原 CD11b 的表达,观察 ATRA 对 HL60 分化水平的影响,用碘化丙啶(PI)染色法观察 ATRA 对 HL60 的细胞周期的影响。**结果** ATRA 治疗 14 d 后,ATRA 组瘤体体积为 $(0.5 \pm 0.6) \text{ cm}^3$, 对照组为 $(1.9 \pm 1.7) \text{ cm}^3$ ($P < 0.05$);体外实验中,ATRA 处理 HL60 细胞 72 h 后,细胞分化相关抗原 CD11b 的表达为 $(27.3 \pm 3.2)\%$, 对照组 $(5.1 \pm 3.2)\%$ ($P < 0.01$);ATRA 处理 HL60 细胞 24 h 后,检测细胞周期分布比例,ATRA 处理组静止期(G_0/G_1 期)细胞比例为 $(57.6 \pm 1.5)\%$, 对照组 $(43.0 \pm 2.0)\%$ ($P < 0.01$)。**结论** ATRA 能够有效抑制 HL60 实体瘤的生长;体外实验证实,ATRA 抑制 HL60 生长的作用机制是诱导细胞 G_0/G_1 期阻滞,诱导细胞分化。

关键词 维甲酸,全反式;白血病,前髓性,急性;HL60

中图分类号 R979.1;R733.71

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)03-0275-03

The Influence of All-trans Retinoic Acid on the Growth of Acute Promyelocytic Leukemia Cell Line HL60

JIN Yuan, DENG Yu, WANG Gui-hua, LI Xiao-lan, GONG Jian-ping, HU Jun-bo (Department of Gastrointestinal Surgery/ Cancer Research Institute, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To study the influence of all-trans retinoic acid(ATRA) on acute promyelocytic leukemia cell line(HL60) differentiation and cell cycle distribution and determine the effective pattern by which ATRA inhibits tumor growth.

Methods To create the HL60 cell line subcutaneous xenograft tumor model in nude mice, which were treated with ATRA through tail vein every other day and the volume of tumor was measured on day 14. *In vitro*, the expression of CD11b, a differentiation marker, was detected by using immunofluorescence technique, and cell cycle was tested by PI stain assay. **Results** The volume of xenograft tumor was $(0.5 \pm 0.6) \text{ cm}^3$ in the ATRA group after 14 days' treatment, which was $(1.9 \pm 1.7) \text{ cm}^3$ in the control group ($P < 0.05$). *In vitro*, the expression of differentiation marker CD11b was $(27.3 \pm 3.2)\%$ in the ATRA group and $(5.1 \pm 3.2)\%$ in the control group ($P < 0.01$) after cultivation for 72 hours. Being co-cultured with ATRA for 24 hours, the cell cycle distribution of HL60 was analyzed, G_0/G_1 phase was $(57.6 \pm 1.5)\%$ in the ATRA group and $(43.0 \pm 2.0)\%$ in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The growth of xenograft tumor was inhibited by ATRA through tail vein injection, which may be associated with cell differentiation induction and cell cycle blockage.

KEY WORDS Retinoic acid, all-trans; Leukemia, promyelocytic, acute; HL60

全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)应用于临床治疗急性前髓性白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是人类白血病治疗史上的里程碑^[1-3]。接受 ATRA 治疗的 APL 患者中 >90% 达到完全缓解(complete remission, CR)^[4]。陈竺等利用 ATRA 治疗 APL 获得了良好的完全缓解率^[5]。但是经治疗缓解后,仍有约 30% 患者复发^[6],其主要原因可能是骨髓内残存的白血病细胞增殖与浸润所致^[7-8]。笔者拟建立 ATRA 对 HL60 治疗作用的体内、体外模型,深入研究如何提高 ATRA 治疗 APL 的缓解率和降低复发率,并为进一步阐明相关作用机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 1640 培养基及胎牛血清购于 Hyclone 公司, ATRA 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自 Sigma 公司,抗人 CD11b-FITC 抗体购于 BD 公司。流式细胞仪 FACSsort 由美国 Becton Dickson 公司生产。

1.2 细胞培养 悬浮细胞 HL60 用含 10% 小牛血清(bovine serum albumin, BSA)、无抗菌药物的 1640 培养液培养,常规置于 37 °C、5% 二氧化碳(CO₂)培养箱中培养。

1.3 裸鼠皮下 HL60 细胞实体瘤模型 裸鼠购自湖

北省实验动物管理中心,置于我院清洁级动物房由专人饲养,实验者具备湖北省动物实验从业人员资质。收取对数生长期的 HL60 细胞,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer sodium, PBS) 洗涤两遍后,将细胞沉淀用含 10% 小牛血清的 1640 培养液稀释为浓度为 $5 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,在裸鼠双后肢外侧皮下注射细胞悬液 100 μL ,7 d 后皮下实体瘤形成。将瘤体等大的小鼠依次均分,共两组,每组 4 只,每只荷瘤两个。对照组:不接受处理;ATRA 组:隔日尾静脉注射 ATRA 溶液(用 1% 乙醇溶液配制,终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $5 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 。14 d 后处死裸鼠并测量实体瘤大小。

1.4 免疫荧光法检测分化相关抗原 CD11b 的表达
细胞处于对数生长期时接种于 6 孔板中,加入 ATRA ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行处理,72 h 后收取细胞,用 PBS 洗涤细胞两遍,加入 2% BSA 100 μL 及抗人 CD11b-FITC 抗体 2 μL ,室温下避光孵育,30 min 后加入 PBS 液 200 μL 在流式细胞仪中检测 CD11b-FITC 的表达比例。

1.5 PI 染色法测定细胞周期分布 细胞处于对数生长期时接种于六孔板中,加入 ATRA ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行处理,24 h 后收集细胞,PBS 洗两遍后用 75% 冰乙醇固定,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜。取固定后细胞 PBS 洗 1 遍,加入 PI ($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 RNAase ($2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),室温孵育,30 min 后加入 PBS 液 200 μL 在流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 12.0 软件对组间进行均数 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATRA 对裸鼠皮下 HL60 细胞实体瘤生长的影响
实体瘤成瘤后分为 ATRA 组和对照组进行处理,14 d 后处死裸鼠并测量实体瘤大小。结果 ATRA 组实体瘤 (0.5 ± 0.6) cm^3 ,对照组实体瘤 (1.9 ± 1.7) cm^3 ($P < 0.05$)。结果提示,静脉给予 ATRA 能够显著抑制

裸鼠皮下 HL60 实体瘤的生长。

2.2 ATRA 对 HL60 细胞分化相关抗原 CD11b 表达的影响 HL60 细胞经过处理 72 h 后,收取细胞用免疫荧光法在流式细胞仪上检测白血病细胞分化相关抗原 CD11b 的表达。结果显示:ATRA 组细胞 CD11b 的阳性率为 (27.3 ± 3.2)%,对照组细胞 CD11b 的阳性率为 (5.1 ± 3.2)% ($P < 0.01$)。结果提示,ATRA 能够显著诱导 HL60 细胞分化。

2.3 ATRA 对 HL60 细胞周期分布的影响 HL60 细胞经过 24 h 处理后,进行 PI 染色分析细胞周期分布。结果 ATRA 组细胞 G_0/G_1 期细胞比例为 (57.6 ± 1.5)%,对照组为 (43.0 ± 2.0)% ($P < 0.01$)。结果提示,ATRA 能有效阻滞 HL60 细胞周期于 G_0/G_1 期。

3 讨论

APL 是血液系统较为常见的恶性肿瘤,严重威胁着人类的健康。APL 是一种以 t(15;17) 染色体转位导致 PML-RAR α 癌蛋白的表达为特征的疾病。ATRA 的诱导分化和细胞周期阻滞作用已被成功应用于临床治疗实践中,这使得该疾病的预后明显改善^[9]。据统计,ATRA 治疗 APL 的临床缓解率高达 90% ~ 95%,5 年无病生存率达到 74%^[5]。虽然如此,但是经治疗后仍有约 30% 的复发率,影响了该疾病的远期疗效。因此,如何进一步提高 ATRA 诱导治疗的缓解率和远期存活率,降低疾病的复发率成为了目前研究的热点。

本研究结果提示,裸鼠皮下 HL60 实体瘤模型建立成功,静脉给予 ATRA 能够显著抑制肿瘤的生长。在体外实验中证实,ATRA 有诱导 HL60 细胞向粒细胞分化的作用,同时观察细胞周期,发现 ATRA 能够有效将 HL60 细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期。这解释了 ATRA 可能通过诱导 HL60 细胞分化并将细胞周期阻滞在静止期进而抑制 HL60 肿瘤生长。

本研究利用经典的 APL 分化诱导药 ATRA,在体内和体外实验中验证了其对 HL60 细胞的诱导分化、细胞周期阻滞的影响及其抑瘤作用,为进一步研究 ATRA 对 HL60 细胞的治疗作用,研发新的诱导白血病分化、抑制肿瘤生长的药物打下了实验基础。

参考文献

[1] BREITMAN T R, SELONICK S E, COLLINS S J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1980,77(5):2936-2940.
[2] NIEDERREITHER K, DOLLE P. Retinoic acid in development: towards an integrated view [J]. Nat Rev Genet, 2008,9(7):541-553.
[3] SCHUG T T, BERRY D C, SHAW N S, et al. Opposing

收稿日期 2011-07-28 修回日期 2011-10-20

基金项目 * 国家“973”项目基金资助项目 (2009CB521802);国家自然科学基金资助项目 (30872472, 30973496,30800569,81072431);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2011JC062,2011JC063);华中科技大学自主创新基金资助项目 (2010MS027)

作者简介 金源 (1986-),男,湖北荆州人,在读硕士,专业方向:外科学与分子生物学。电话:(0) 13720325534, E-mail: yuanjin_860912@163.com。

通讯作者 胡俊波,男,湖北鄂州人,教授,博士生导师,从事胃肠外科疾病研究。电话:027-83663856, E-mail: jbh@tjh.tjmu.edu.cn。

- effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors[J]. *Cell*, 2007, 129(4):723-733.
- [4] SANZ M A. Recent advances in the treatment of APL[J]. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2006, 4(10):727-729.
- [5] WANG Z Y, CHEN Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable [J]. *Blood*, 2008, 111(5):2505-2515.
- [6] 张新华, 王军, 冉启杰, 等. 维甲酸与亚砷酸联合蒽环类抗生素治疗急性早幼粒细胞白血病[J]. *医药导报*, 2009, 28(8):1041-1043.
- [7] 高蕾, 刘林, 陈幸华, 等. 大剂量化疗、自体外周血造血干细胞移植、长间歇维持化疗序贯治疗成人急性淋巴细胞白血病疗效观察[J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27(8):564-565.
- [8] 卜晋安, 饶慧琴, 张秀芳, 等. 联合化疗治疗急性白血病 100 例[J]. *医药导报*, 2009, 28(5):606-607.
- [9] GRIMWADE D, MISTRY A R, SOLOMON E, et al. Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for differentiation therapy[J]. *Cancer Treat Res*, 2010, 145(1):219-235.
- DOI 10.3870/yydb.2012.03.002

丹红注射液对大鼠肝微粒体 5 种 CYP 亚型酶活性的影响*

余小翠, 黄丽军, 刘高峰, 张香凝

(哈尔滨医科大学附属第二医院药学部、黑龙江省高校重点实验室, 150086)

摘要 目的 研究丹红注射液对 5 种细胞色素 P₄₅₀ 亚型酶活性的影响, 为临床合理用药提供参考。方法 采用大鼠体外肝微粒体孵育法, 分别以非那西丁、甲苯磺丁脲、右美沙芬、氯唑沙宗、睾酮为 CYP1A2、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 的探针药物, 在大鼠肝微粒体孵育体系中孵育, 用高效液相色谱(HPLC)法测定相应的代谢产物, 比较空白对照组和丹红注射液低、中、高剂量组之间探针药物代谢率的差异, 评价丹红注射液对各亚型酶活性的影响。结果 在体外肝微粒体孵育体系中, 丹红注射液低剂量组中 CYP1A2 和 CYP2C9 活性与空白对照组相比, 差异无统计学意义($P>0.05$); 中和高剂量组中 CYP1A2 和 CYP2C9 活性与空白对照组相比降低, 差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 丹红注射液低、中、高剂量组中 CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 的活性与空白对照组相比, 差异无统计学意义($P>0.05$)。丹红注射液对大鼠肝微粒体 CYP1A2 酶活性的半数抑制浓度(IC_{50})和抑制常数(K_i)分别为 0.54% 和 0.226%。结论 丹红注射液对大鼠肝微粒体 CYP1A2 酶活性有抑制作用, 且为混合型抑制; 对 CYP2C9 有弱抑制作用; 对 CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 酶活性无明显影响。

关键词 丹红注射液; 肝微粒体法; 细胞色素 P₄₅₀; 探针药物

中图分类号 R286; R285.5

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)03-0277-05

Effects of *Danhong* Injection on Activities of Five Cytochrome P₄₅₀ Enzymes in Rat Liver Microsomes

YU Xiao-cui, HUANG Li-jun, LIU Gao-feng, ZHANG Xiang-ning (Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Key Laboratory of University in Heilongjiang Province, Harbin 150086, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of *danhong* injection on the activities of five cytochrome P₄₅₀ enzymes *in vitro* for clinical combination therapy. **Methods** Phenacetin, tolbutamide, dextrophan, chlorzoxazone, testosterone were incubated as probes with or without *danhong* injection at low, middle and high concentrations. HPLC method was used to detect the substrate metabolites to study the effects of *danhong* injection on the activities of five cytochromes P₄₅₀ enzymes. **Results** *In vitro*, the activities of CYP1A2 and CYP2C9 in *danhong* injection groups were lower than that in the blank group ($P<0.05$); but no significant difference was presented for CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4 in *danhong* injection groups compared with the control group ($P>0.05$). with the IC_{50} value and K_i value were 0.54% and 0.226%, respectively. **Conclusion** *Danhong* injection remarkably inhibits the activity of CYP1A2 *in vitro* in a mixed-type inhibition model. It also weakly suppresses the activity of CYP2C9, but not on CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 activities.

KEY WORDS *Danhong* injection; Liver microsomes; Cytochrome P₄₅₀; Probe drugs