

烷化溶血磷脂 ET-18-OCH₃ 对 K562 细胞作用的研究

石奇珍 黄慧芳 陈志哲 吕联煌

(福建医科大学附属协和医院 福建省血液病研究所 福州 350001)

烷化溶血磷脂 ET-18-OCH₃ (Alkyl-lysophospholipid, ALP) 是一种醚脂 (etherlipid), 其化学结构与溶血磷脂酰胆碱相似, 具有直接的肿瘤细胞杀伤作用, 是新一类抗肿瘤药物^[1,2]。在国外已进入 I/II 期临床试验^[3,4], 国内未见类似报道。为研究它在白血病治疗中的作用, 我们以白血病细胞株 K562 为对象, 研究 ALP 对 K562 细胞的细胞学效应, 以及对 K562 细胞中具有重要意义的抗凋亡基因 bcr-abl mRNA 及其蛋白表达产物 P210 的影响, 现将结果报道如下。

材料与方 法

1. 研究对象

(1) 细胞株 K562 系慢性粒细胞白血病急性红白血病变, 引自福建省医学科学研究所, 培养条件: 含 10% 胎牛血清 (Gibco)、50 μ g/ml 链霉素、50IU/ml 青霉素的 RPMI 1640 (Gibco) 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 完全饱和湿度培养箱中培养。实验所用的细胞处于对数生长期, 台盼蓝拒染率 >95%。

(2) 正常对照 抽取 4 例健康自愿者骨髓液, 用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 光学显微镜下参照白细胞计数法计数。

2. ALP 及其与细胞作用

ALP 粉剂由德国慕尼黑大学 H. J. Kolb 教授惠赠。经 10% 胎牛血清 RPMI 1640 溶解成浓度为 10mg/ml, 置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用 (已溶解的 ALP 应在 9 个月之内用, 以保证其活性), 用前稀释为 1 μ g/ml。K562 细胞初始浓度为 1 \times 10⁵/ml, 正常对照组细胞初始浓度为 5 \times 10⁵/ml, ALP 终浓度为 1 μ g/ml - 80 μ g/ml, 作用不同时间, 以观察不同的指标。若短时间作用, 则终止时以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基洗涤两遍, 再行相应的处理。

3. 台盼蓝拒染测定细胞抑制率

K562 细胞接种于 96 孔塑料培养板上, 每组设三个平行孔, 每孔总体积为 200 μ l, 经相应处理后, 每天倒置显微镜下活体观察, 取细胞悬液 15 μ l, 加 0.4% 台盼蓝染液 15 μ l 混匀, 计死活细胞数, 计算细胞生长抑制率和半数抑制浓度 (IC₅₀)^[5]。

4. 克隆形成试验

(1) CFU-K562 培养 K562 细胞经不同浓度药物处理后经 RPMI 1640 培养基清洗计活细胞数, 稀释为 6000/ml 单细胞悬液, 于 24 孔塑料培养板 (Gibco) 上预加 0.8% 甲基纤维素 (CPS 4000, Sigma) RPMI 1640 培养基 1.0 ml/孔, 加上述单细胞悬液 50 μ l, 使每孔细胞数 300 个, 混匀置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 完全饱和湿度培养箱中培养 7 天, 计克隆数, 计算克隆形成率和细胞存活率^[5]。

(2) CFU-GM 培养 经 ALP 处理后的对照组细胞经 RPMI 1640 培养基清洗, 台盼蓝拒染法计数后取活细胞进行集落培养, 培养体系为: RPMI 1640 培养基、0.8% 甲基纤维素、20% 胎牛血清、10% 人 AB 血清、GM-CSF 5ng/ml、IL-3 20U/ml, 种植细胞数终浓度为 5 \times 10⁵/ml, 于 24 孔培养板上, 每孔总体积为 1.0ml, 培养条件同上。

5. P210 蛋白表达的检测

K562 细胞经药物作用不同时间后, 用 PBS 洗 2 遍, 加入 bcr 单克隆抗体 (1:400) (Santa Cruz Biotechnology Inc), 4 $^{\circ}$ C 放置半小时, 加入等量的 FITC 标记的兔抗鼠 IgG, 4 $^{\circ}$ C 放置半小时, 经流式细胞仪 (Bio Rad BRYTE HS 美国) 测定 K562 细胞 P210 蛋白表达水平。

6. RT-PCR 检测 bcr-abl mRNA 表达

收集不同处理组培养 48 小时的 K562 细胞 PBS 清洗后, 用 RNA 提取液 (Life Technology Inc), 进行总 RNA 提取。cDNA 合成 (RT 试剂盒为 Promega 产品) 按试剂盒说明书进行。PCR 扩增含 bcr-abl 融合点在

本文 1999 年 8 月 17 日收到, 2000 年 4 月 25 日接受。

内特异片段,同时以 β -actin 为内参照,PCR 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳,经凝胶图像分析仪(Gel Doc 1000 型 Bio-Rad)分析,计算 bcr/abl 与 β -actin 荧光强度的比值。

所用引物根据 bcr-abl 与 β -actin 的 cDNA 序列,应用 oligo dT 软件自行设计,由本所 DNA 合成仪合成,引物序列、扩增片段长度、退火温度等参数见附表。

附表 RT-PCR 扩增的引物序列、扩增片段长度及退火温度

	引物序列	片段长度 (bp)	退火温度 (°C)
β -actin	a 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3'	548	55
	b 5' CTT TAG CAC GCA CTG TAA TTC CTC 3'		
bcr/abl	a 5' GGC TTC ACT CAG ACC CTG AGG 3'	332	55
	b 5' AGG GTG CAC AGC CGC AAC GGC 3'		

7. 细胞凋亡检测

(1) DNA 含量的测定

收集药物作用后细胞 1×10^6 加到 kenesis 50 kit (Bio RAD) 中,置 18-25°C 暗室温育 30 分钟,应用流式细胞仪作 DNA 含量分析。

(2) 细胞形态学的电镜观察

收集经药物作用后细胞以 2.5% 戊二醛及 1% 多聚甲醛混合液固定,饿酸后固定,包埋切片,轴铅染色, HU-12A 型电镜观察、拍照。

结 果

1. 不同浓度 ALP 对 K562 细胞生长数的影响

(1) ALP 与 K562 细胞持续作用时,终浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 对细胞数没有明显的影响,与空白组比较差别无显著意义 ($P > 0.05$)。当浓度达 $5 \mu\text{g/ml}$ 时,细胞数即明显低于空白组 ($P < 0.01$)。 $5 \mu\text{g/ml}$ 组及 $10 \mu\text{g/ml}$ 组指数生长期细胞倍增时间分别为 43.5h 和 58.3h,是空白对照组(14h)的 3.1 倍和 4.2 倍。 $20 \mu\text{g/ml}$ 作用 48 小时后细胞即处于负增殖状态, $40 \mu\text{g/ml}$ 组的细胞生长完全抑制(图 1A)。

(2) ALP 终浓度为 $40 \mu\text{g/ml}$ 作用短时间,经 RPMI 1640 洗涤后再培养,细胞生长也明显受抑制,作用 1h,其活细胞数较空白组即明显减少 ($P < 0.05$) (图 1B)。

2. ALP 作用后 K562 细胞株生长的变化

(1) 若计算细胞生长抑制率 [= (1 - 实验组细胞数/对照组细胞数) $\times 100\%$], 不同浓度 ALP 和不同作用时间对 K562 细胞生长有不同程度的抑制(图 2), 其作用 24、48、72h 对 K562

细胞的 IC_{50} 分别为 31.6、22.3、14.8 $\mu\text{g/ml}$ 。

(2) K562 细胞克隆原细胞存活率随 ALP 浓度增大呈指数下降(图 3)。ALP $30 \mu\text{g/ml}$ 对 K562 细胞杀伤达 1 个指数以上(24h 1.0, 48h 1.65), 当 ALP 浓度达 $40 \mu\text{g/ml}$ 作用 24h、48h

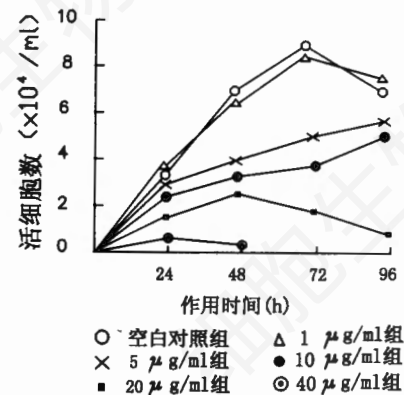


图 1A ALP 持续作用后 K562 细胞数的变化

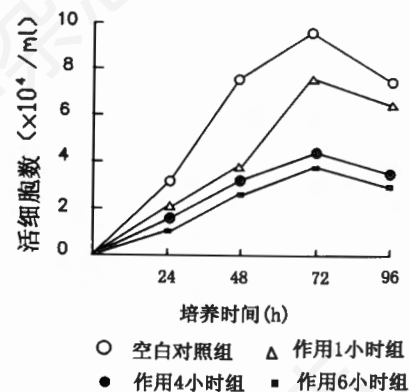


图 1B ALP 作用短时间后再培养细胞数变化

及72h, K562细胞存活率分别为0.7, 0, 0。但正常对照组 CFU-GM 集落形成率并未受影响。

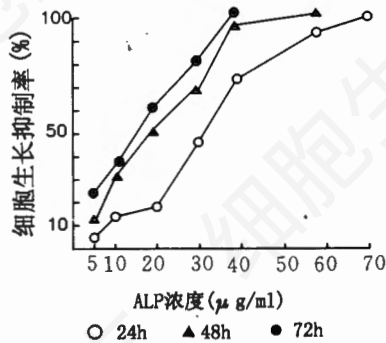


图2 ALP对K562细胞生长的抑制

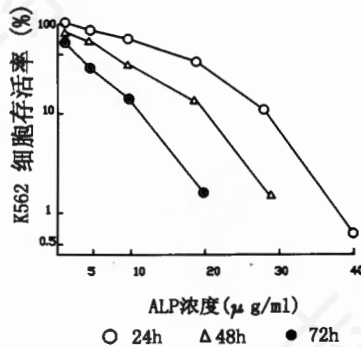


图3 ALP对K562细胞的剂量存活曲线

(3) 倒置显微镜下发现空白组 K562 细胞生长呈细胞团致密生长, ALP 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下浓度作用组细胞仍可成团生长, 当浓度达 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 只要作用 1 小时, 清洗后再培养的细胞生长分散、平铺不成团。

3. ALP对K562细胞P210蛋白表达的影响

应用流式细胞仪检测发现 K562 细胞空白组 P210 蛋白表达阳性率为 99.1%; K562 经 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 ALP 持续作用 5 天, P210 阳性率为 60.1%; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ALP 持续作用 5 天, 阳性率为 48.1%; 若药物终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 作用 6 小时后, 清洗后再培养 2 天, P210 表达率为 65.8%; 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ALP 作用 1 小时清洗后再培养 2 天, P210 表达阳性率为 33.0%。

4. ALP对K562细胞 bcr-abl mRNA 表达的影响

PCR 产物电泳可见 332bp 及 548bp 两条带, 凝胶图像分析 bcr/abl 与 β -actin 的荧光强度比值结果为: K562 空白对照组为 0.57, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组为 0.45; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组为 0.41; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组为 0.37; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 6 小时组为 0.48; 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 1 小时组为 0.36; 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 4 小时组为 0.18 (荧光强度代表 mRNA 的水平)。说明 ALP 处理后 K562 细胞 bcr-abl mRNA 水平有下降 (图 4)。

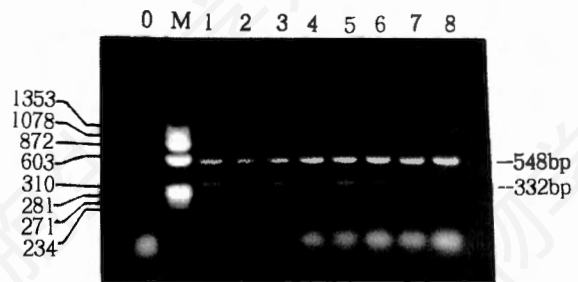


图4 不同处理组 K562 细胞 bcr-abl mRNA 表达变化

M. Φ X174 DNA/Hae III Markers; O. 不加 cDNA 为 PCR 阴性对照; 1. K562 细胞空白对照组; 2. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组; 3. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组; 4. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组; 5. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组作用 6 小时; 6. 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 1 小时组; 7. 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 4 小时组; 8. HL-60 细胞, 为 bcr-abl 阴性对照。

5. ALP诱导K562细胞凋亡

用流式细胞仪检查发现, ALP 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理 1 小时 K562 细胞即可见凋亡, 凋亡率为 11.5%; 若处理 4 小时, 则凋亡率为 29.8%, 空白对照组未见凋亡峰 (图 5)。电镜观察 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 4 小时的 K562 细胞部分呈典型凋亡形态学改变, 表现为核染色质浓缩边聚呈颗粒状, 半月型, 另有部分细胞的胞膜受破坏。若较大剂量作用于细胞则呈溶解性坏死改变, 当药物浓度达 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 作用 2 分钟, 倒置显微镜下即可见细胞呈溶解性坏死, 成为碎片, 但此时正常对照组细胞未见形态学改变, 流式细胞仪检测凋亡率为 0。

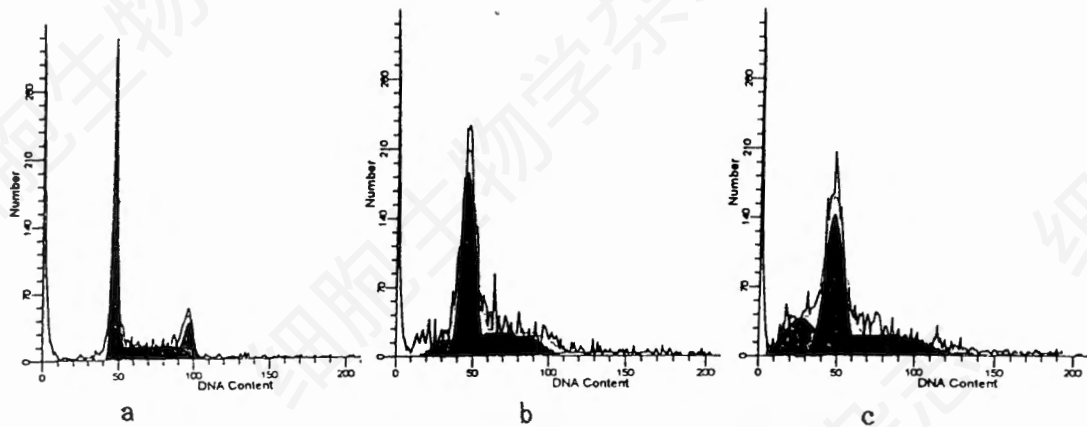


图5 ALP作用后K562细胞的细胞周期分析

a. K562细胞空白对照组; b. ALP 40 μ g/ml作用1小时组; c. ALP 40 μ g/ml作用4小时组。

讨 论

ALP是选择性作用于细胞膜的抗肿瘤药物,其分子结构稳定,只能被烷基裂解酶(OAC酶)降解灭活。虽然ALP选择性抗肿瘤作用的机理至今未完全阐明,但已有研究发现正常细胞(包括造血细胞)具有正常的OAC酶,细胞与ALP接触后,ALP及时被降解,而肿瘤细胞中OAC酶很低或缺乏,造成ALP在肿瘤细胞中堆积,它可通过增强细胞膜流动性与渗透性,抑制PKC活性,抑制细胞膜磷脂生物合成与代谢,导致细胞膜损伤,Na⁺-K⁺-ATP酶活性受抑制,钠泵不能正常运转,细胞信号的传递受阻,最终引起细胞增殖受抑制或死亡^[6]。这对于白血病治疗中的自体骨髓移植体外净化具有特别重要的意义。

本文观察结果表明,ALP对人白血病K562细胞具有明显的细胞毒作用和抑制细胞生长作用,表现为作用时间及浓度依赖性,细胞增殖速度显著变慢,5 μ g/ml时倍增时间延长3.1倍以上,40 μ g/ml时生长可达完全抑制,克隆原细胞存活曲线呈指数型,提示ALP对K562细胞作用为一级动力学,无坪值,可能无明显细胞周期选择性。

本实验结果还提示ALP作用后,存在后余效应,当ALP浓度达40 μ g/ml作用1-6小时,即使中断ALP的继续作用,K562细胞增殖仍明显受抑制,P210蛋白水平仍显著低于空白对照组。低浓度(1 μ g/ml)时细胞数虽未受明显影响,但是克隆原细胞存活率已受抑制,说明小剂量ALP对白血病细胞的抑制作用主要是抑制细胞的生存,即处理后细胞存活期明显缩短。

ALP还具有诱导K562细胞凋亡的作用。文献报道,ALP可诱导与凋亡有关的基因c-myc表达,还能抑制CTP(磷酸胆碱酰基转移酶),从而抑制磷脂酰胆碱的合成而诱导细胞凋亡^[7]。我们实验发现ALP具有下调K562细胞bcr-abl mRNA及P210蛋白表达的作用,而bcr-abl是抑制慢性粒细胞白血病(CML)细胞凋亡的基因,P210是CML细胞生长的一种内在刺激物^[8]。因此,ALP在诱导K562细胞凋亡过程中,其bcr-abl mRNA及P210水平的下调可能也是一重要因素。

同时ALP对K562细胞也具有细胞毒的作用,当ALP剂量较大时,作用短时间即可见细胞呈溶解性坏死的变化,这可能是ALP增强细胞膜通透性,抑制Na⁺-K⁺交换系统活性,抑制细胞膜磷脂的生物合成和代谢,对细胞膜的

直接损伤引起的。

因此,我们认为 ALP 对 K562 细胞生长具有明显抑制作用,抑制程度呈剂量及时间依赖性,它对白血病细胞具有毒性及诱导凋亡的双重作用,具有一定的抗白血病效应,临床上可利用这一点将 ALP 作为治疗白血病的药物,亦可作为骨髓净化的一种手段,当然对其毒性及最佳有效剂量有待进一步研究。

摘 要

为研究烷化溶血磷脂 ET-18-OCH₃(ALP) 的抗白血病效果,本文以 K562 细胞为研究对象,通过台盼蓝拒染法测定 ALP 作用后 K562 细胞的生长抑制率和生长曲线;甲基纤维素半固体培养法测定克隆原细胞的存活率;流式细胞仪检测 K562 细胞 P210 蛋白表达;RT-PCR 半定量法测定细胞的 bcr-abl mRNA;采用流式细胞仪进行 DNA 分析以及电镜观察细胞形态学改变。结果显示,K562 细胞经 ALP 处理后细胞生长明显受抑制,呈作用时间和剂量的依赖性,IC₅₀ 为 31.6(24h),22.3(48h),14.8(72h) $\mu\text{g}/\text{ml}$;细胞增殖速度显著降低,克隆原细胞存

活曲线呈指数型,而正常对照组细胞的 CFU-GM 则未受影响;ALP 还可使 K562 细胞 P210 及 bcr-abl mRNA 水平下调,并有诱导细胞凋亡的作用。说明 ALP 对 K562 细胞生长具有明显抑制作用,并有诱导细胞凋亡作用,提示 ALP 具有一定的抗白血病效应。

关键词:烷化溶血磷脂 K562 细胞株 体外抗肿瘤作用

参 考 文 献

- [1]Hoffmann,D. R. ,1986, *Cancer Res.* ,**46**(11):5803-5809.
- [2]Vogler,W. R. ,1993, *Lipids* ,**28**(6):511-516.
- [3]Vogler,W. R. , et al. ,1993, *J Hemalother* ,**2**(1):93-102.
- [4]Koenigsmann, M. P. , et al. , 1996, *Bone Marrow Transplant* ,**18**(3):549-557.
- [5]徐承熊,1991,药理学实验方法学,徐淑云主编,pp1440-1445,人民卫生出版社,北京.
- [6]Andreesen,R. , et al. , 1978, *Cancer Res.* , **38**(11):3894-3899.
- [7]Mollinedo. F. , et al. ,1997, *Cancer Res.* ,**57**(7):1320-1328.
- [8]Konpka,J. B. , et al. ,1984, *Cell* ,**37**(5):1035-1042.

THE EFFECT OF ALKYL-LYSOPHOSPHOLIPID ET-18-OCH₃ ON K562 CELL

SHI Qi Zhen HUANG Hui Fang CHEN Zhi Zhe LU Lian Huang

(Union Hospital affiliated to Fujian Medical University, Fujian Institute of Hematology, Fuzhou 350001)

ABSTRACT

To study the anti-leukemic effects of alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH₃(ALP) on K562 cell, cell inhibitory rate and growth curve were determined by trypan blue dye exclusion. CFU-K562 cells were cultured in 0.8% methylcellulose. P210 was measured by flow cytometry. Cellular bcr-abl mRNA was detected by RT-PCR semi-quantitative analysis. Cells apoptosis was measured by flow cytometry and observed by electron microscopy. The result showed that the growth of K562 cell was significantly inhibited as treated with ALP, showing time-quantity dependent effects. The IC₅₀ to K562 cell of ALP was 31.6, 22.3, 14.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ after in vitro treatment for 24, 48, 72h, respectively. The cell proliferation markedly decreased in K562 cell. Cloning forming efficiency assay suggested a μg effect dose-survival curve of exponential type. ALP also decreased cellular bcr-abl mRNA and P210 expression and induced K562 cell apoptosis. These results suggest that ALP has significant inhibitory effect on growth of K562 cell and also induces apoptosis in K562 cell.

Key words: Alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH₃ K562 cell Antitumor activity