

- Infect Dis, 2006, 43(4):518-524.
- [2] Montravers P, Dupont H, Bedos JP, et al. Tigecycline use in critically ill patients: a multicentre prospective observational study in the intensive care setting [J]. Intensive Care Med, 2014, 40(7): 988-997.
- [3] Kadoyama K, Sakaeda T, Tamon A, et al. Adverse event profile of tigecycline: data mining of the public version of the U.S. Food and Drug Administration adverse event reporting system [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(6):967-970.
- [4] 李昱霖, 梁志欣, 王彬, 等. 替加环素不良反应回顾性分析 [J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(2):111-114.
- [5] 吴冰, 陈世耀. 替加环素致肌酐水平升高 1 例 [J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(4):253-254.
- [6] 黄晓军, 吴德沛, 刘代红. 实用造血干细胞移植 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014, 269-274.
- [7] 沈志祥. 血液病患者药物性肝损伤的预防和规范化治疗专家共识 [J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(3):252-256.
- [8] McLaughlin M, Advincula MR, Malczynski M, et al. Correlations of antibiotic use and carbapenem resistance in enterobacteriaceae [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(10):5131-5133.
- [9] 刘又宁. 替加环素带来的希望与困惑 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(1):2-3.
- [10] Averbuch D, Cordonnier C, Livermore DM, et al. Targeted therapy against multi-resistant bacteria in leukemic and hematopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 4th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-4, 2011) [J]. Haematologica, 2013, 98(12):1836-1847.
- [11] Chemaly RF, Hanmod SS, Jiang Y, et al. Tigecycline use in cancer patients with serious infections: a report on 110 cases from a single institution [J]. Medicine (Baltimore), 2009, 88(4):211-220.
- [12] Bassetti M, Poulakou G, Giamarellou H. Is there a future for tigecycline? [J]. Intensive Care Med, 2014, 40(7):1039-1045.
- [13] Bucaneve G, Micozzi A, Picardi M, et al. Results of a multicenter, controlled, randomized clinical trial evaluating the combination of piperacillin/tazobactam and tigecycline in high-risk hematologic patients with cancer with febrile neutropenia [J]. J Clin Oncol, 2014, 32(14):1463-1471.
- [14] 高苏, 李正, 仇慧英, 等. 替加环素治疗血液病粒细胞缺乏患者感染疗效分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(4):860-866.

(收稿日期:2015-03-15)

(本文编辑:徐茂强)

三氧化二砷对人白血病细胞系 MV4-11 细胞增殖和凋亡的影响

马影影 沈照华 邹仲敏 曾东风 杨世杰 张曦 孔佩艳

Effect of arsenic trioxide on proliferation and apoptosis of human leukemia cell line MV4-11 cells Ma Yingying, Shen Zhaohua, Zou Zhongmin, Zeng Dongfeng, Yang Shijie, Zhang Xi, Kong Peiyan

Corresponding author: Kong Peiyan, Department of Hematology, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China. Email: peiyankong@aliyun.com

FLT3 内部串联重复 (FLT3-ITD) 突变阳性的急性髓系白血病 (AML) 患者通常伴有外周血白细胞及骨髓原始细胞计数高、缓解率低、易复发、临床预后差等独特的临床特征。尽

管联合化疗或联合造血干细胞移植可能改善 FLT3-ITD 阳性 AML 患者的预后, 但仍有较高的复发率和病死率。三氧化二砷 (As₂O₃) 与全反式维甲酸的联合应用已使急性早幼粒细胞白血病 (APL) 成为可治愈的疾病。对于合并 FLT3-ITD 突变的 APL 患者仅给予 As₂O₃ 和全反式维甲酸治疗后, 其 FLT3-ITD 突变可迅速转阴并保持持续阴性, 并未提示明显的预后不良; 有研究表明 As₂O₃ 在合并 FLT3-ITD 突变的 APL 患者中可首先诱导 FLT3-ITD 转阴, 其机制未明。因此推测 As₂O₃ 可能对非 APL 的 FLT3-ITD 突变阳性 AML 细胞也具有一定的作用。在本研究中我们以 FLT3-ITD 阳性的 AML-M₂ 细胞系 MV4-11 细胞为研究对象, 观察比较 As₂O₃ 对人 MV4-11 细胞的增殖抑制作用和诱导凋亡作用。

材料和方法

一、实验材料

1. 药物和试剂: As₂O₃ 注射液购于黑龙江哈尔滨医药大药业有限公司 (批号 20130801), 药物浓度 1 g/L。用 PBS 配制

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.018

作者单位: 400037 重庆, 第三军医大学新桥医院血液科, 全军血液病中心 (马影影、沈照华、曾东风、杨世杰、张曦、孔佩艳); 第三军医大学预防医学毒理研究所 (邹仲敏)

通信作者: 孔佩艳, Email: peiyankong@aliyun.com

成浓度为1 mmol/L的储存液,使用前用含10%新生牛血清、100 U/L青霉素、100 U/L链霉素的RPMI 1640培养液稀释至所需药物浓度。RPMI 1640培养液、IMDM培养液、新生牛血清购自HyClone公司。

2. 细胞株: MV4-11为伴B系表达的急性粒-单核细胞白血病细胞株,其FLT3-ITD基因突变阳性且PML-RAR α 融合基因阴性,购于美国ATCC公司。以HL-60细胞为对照,其FLT3-ITD突变为阴性,购于第三军医大学中心实验室。两种细胞均采用含10%新生牛血清的培养液培养,取对数生长期细胞进行后续的药物干预实验。

二、方法

1. CCK-8法检测细胞增殖抑制率:参考文献[1-3], As₂O₃作用浓度先选择0.5、1、2 μ mol/L进行预实验,分别观察上述浓度As₂O₃干预6、12、24、48、72 h后MV4-11细胞的存活率,根据预实验结果选择后续实验中As₂O₃作用时间为48 h。

调整细胞密度为5 \times 10⁴/ml,接种于96孔板,每孔100 μ l,加入不同浓度的药物10 μ l,使As₂O₃最终浓度分别为0、0.1、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 μ mol/L(浓度范围参考文献[1-3])。设立对照组(未加药)和空白组(不含细胞的RPMI 1640培养液)。在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养48 h后每孔加入10 μ l的CCK-8溶液,孵育4 h,用酶标仪测定450 nm处的吸光度(A)值,按下列公式计算细胞增殖抑制率,并用graphpad prism 5软件计算IC₅₀值。每组设6个平行孔,实验重复3次。

细胞增殖抑制率(%)=[1-(A_{实验孔}-A_{空白孔})/(A_{对照组}-A_{空白孔})] \times 100%

2. 细胞凋亡的检测:根据细胞增殖实验的结果选择As₂O₃作用时间为48 h,取对数生长期MV4-11、HL-60细胞接种于6孔板,收集经0.25、0.5、1 μ mol/L As₂O₃(浓度范围参考文献[1-2, 4])处理48 h后的细胞(约10⁶细胞),另设不加药对照组,用PBS洗涤2次,按Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,进行流式细胞术检测。

三、统计学处理

应用SPSS 13.0软件进行统计学分析,两者相关性分析采用Spearman秩和检验。P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. As₂O₃对MV4-11细胞增殖的抑制作用:采用CCK-8法测定不同浓度As₂O₃作用48 h后MV4-11细胞增殖抑制率,发现实验组细胞增殖抑制率均显著高于不加药对照组(P<0.01),其IC₅₀值为0.983(95% CI 0.912~1.059) μ mol/L。As₂O₃对HL-60细胞的增殖抑制作用与MV4-11细胞类似,其IC₅₀值为1.060(95% CI 0.953~1.179) μ mol/L(图1)。

2. As₂O₃对MV4-11和HL-60细胞凋亡的影响:流式细胞术检测As₂O₃作用48 h后细胞凋亡率,结果如图2、3所示,0.25、0.5、1 μ mol/L As₂O₃作用组MV4-11细胞凋亡率分别为19.04%、23.90%、28.53%,HL-60细胞凋亡率分别为9.80%、8.64%、18.10%,凋亡率随着药物浓度的增高而增加,呈剂量

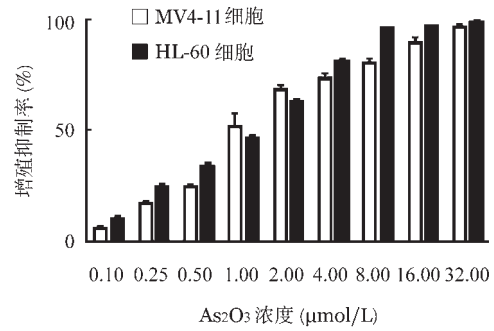


图1 三氧化二砷(As₂O₃)对MV4-11细胞增殖的影响

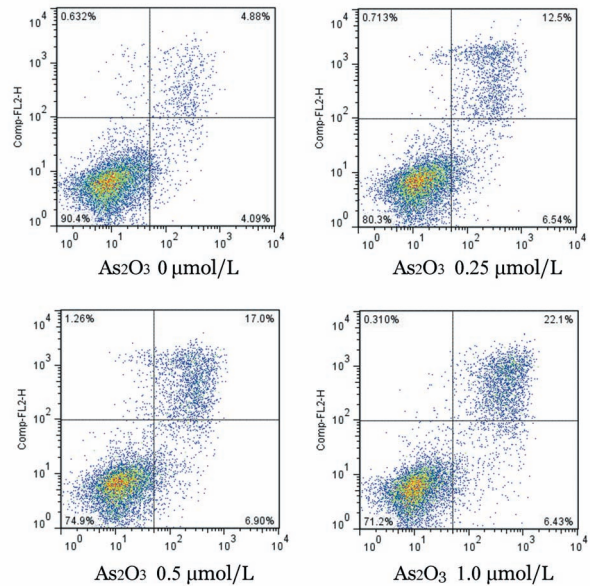


图2 不同浓度三氧化二砷(As₂O₃)作用48 h对MV4-11细胞凋亡的影响

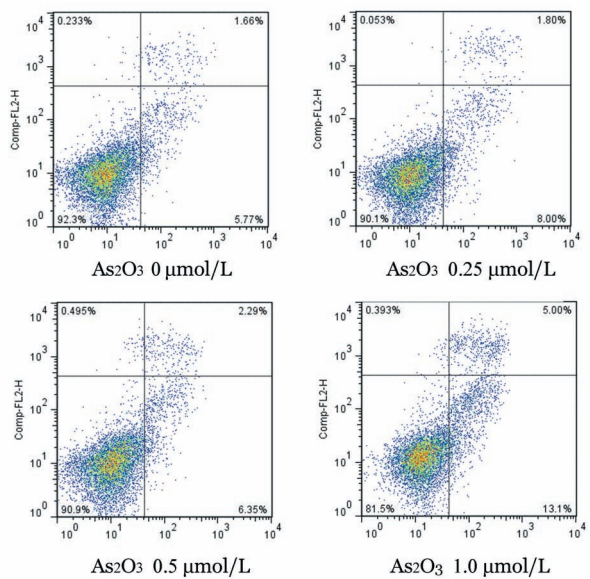


图3 不同浓度三氧化二砷(As₂O₃)作用48 h对HL-60细胞凋亡的影响

依赖性,各组间细胞凋亡率的差异均有统计学意义(P 值均 <0.05)。

讨 论

As₂O₃治疗 APL 的机制主要是诱导细胞凋亡,其次为诱导细胞分化^[5-7]。As₂O₃诱导细胞分化主要是通过抑制丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路减少甲状腺素沉默介导因子(SMRT)的磷酸化,快速抑制 SMRT 共抑制物与 PML-RAR α 融合蛋白之间的相互作用,从而诱导分化;并可通过抑制下游 PI3K/AKT 信号通路诱导 APL 细胞系 NB4 细胞和胃癌细胞系 SGC-7901 细胞的凋亡^[8-9]。FLT3-ITD 突变是近年来在 AML 患者中发现的 FLT3 基因最常见的一种突变类型,其主要作用机制为启动配体非依赖性磷酸化,使受体可以不依赖配体发生自动聚合、自动磷酸化及组成性活化开启下游包括 Ras/MAPK、PI3K/AKT 和 JAK/STAT 等涉及细胞增殖、分化、存活的信号通路,抑制 AML 细胞凋亡和促进白血病克隆的增殖优势,致使该类患者以化疗耐药、缓解率低、复发率高和预后不良的临床特征,其治疗迄今未获得重大突破。

FLT3-ITD 突变在 AML 各亚型中均可发生,其中尤以 APL 和 M₃ 型较为多见。30%~50% 的 APL 患者合并 FLT3-ITD 突变。虽然这类患者仍表现为高龄及高白细胞特征,但接受 As₂O₃ 联合维甲酸治疗后,FLT3-ITD 可迅速转阴,甚至早于 PML-RAR α ^[8],长期治疗效果和未合并 FLT3-ITD 突变患者相比未见明显差异,表明 FLT3-ITD 在 APL 中并不是预后不良的指标。由于 As₂O₃ 可抑制 FLT3 下游 PI3K/AKT 信号通路^[9-10],因此推测 As₂O₃ 可通过抑制 FLT3 下游 PI3K/AKT 信号通路,使 FLT3-ITD 的配体非依赖性磷酸化减少而发挥治疗作用。基于上述,我们拟通过观察 As₂O₃ 对 MV4-11 细胞(FLT3-ITD 阳性细胞株,来源于 AML-M₃)的增殖抑制和诱导凋亡作用,探讨其对非 APL 的 FLT3-ITD 阳性 AML 的作用及可能的作用机制,为下一步研究其在非 APL 的 FLT3-ITD 阳性 AML 治疗中的潜在应用价值奠定基础。

以往的研究结果显示,As₂O₃ 具有诱导分化和诱导凋亡的双重作用,其在低浓度时(0.1~0.5 $\mu\text{mol/L}$)只是引起细胞分化,而在 0.5~2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时则会诱导细胞凋亡,因此本实验诱导细胞凋亡的药物浓度选择为 0.25、0.5、1 $\mu\text{mol/L}$;在增殖抑制试验中摸索出最适作用时间为 48 h。我们采用 CCK-8 法测定 As₂O₃ 对 MV4-11 细胞的增殖抑制作用,以对 As₂O₃ 高敏感的 FLT3-ITD 阴性的 HL-60 细胞作为阳性对照,未加药组作为阴性对照。结果显示,As₂O₃ 对 MV4-11 细胞的抑制增殖作用呈浓度依赖性,在作用 24 h 即可显示明显的细胞增殖抑制作用,并随着作用时间的延长这种作用会越来越明显,与对 As₂O₃ 高敏感的 HL-60 细胞组相比较,二者在 As₂O₃ 作用 48 h 后的 IC₅₀ 值相近,且增殖抑制曲线基本一致,两者在同一浓度 As₂O₃ 干预 48 h 后的细胞增殖抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$)。采用 Annexin V/PI 试剂盒检测细胞凋亡,结果

显示 As₂O₃ 对 MV4-11 细胞有明显的诱导凋亡的作用,并呈浓度依赖性,0.25、0.5、1 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 作用 48 h 后, MV4-11 细胞凋亡率明显高于对照组,在 As₂O₃ 2 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h 后甚至可达 44.4%。

在本研究中我们发现,As₂O₃ 在体外可明显促进来源于 AML-M₃ 的 MV4-11 细胞的凋亡并抑制其增殖,且与对 As₂O₃ 高敏感的 HL-60 细胞基本一致,提示 As₂O₃ 对非 APL 的 FLT3-ITD 突变患者可能也有较好的疗效,尚需要进一步的深入研究予以证实。

参 考 文 献

- [1] 朱琦,余韵,贾培敏,等. 三氧化二砷联合 8-CPT-cAMP 诱导维甲酸耐药早幼粒细胞白血病细胞分化的实验研究[J]. 中华血液学杂志, 2003, 24 (1): 2-5.
- [2] 蔡循,陈国强,贾培敏,等. 三氧化二砷诱导血液肿瘤细胞凋亡的机制研究[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(6): 452-454.
- [3] Jiang G, Albiñ A, Tang T, et al. Role of Myc in differentiation and apoptosis in HL60 cells after exposure to arsenic trioxide or all-trans retinoic acid[J]. Leuk Res, 2008, 32(2): 297-307.
- [4] Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, et al. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho)[J]. Leukemia, 1997, 11(9): 1447-1452.
- [5] Shen Y, Shen ZX, Yan H, et al. Studies on the clinical efficacy and pharmacokinetics of low-dose arsenic trioxide in the treatment of relapsed acute promyelocytic leukemia: a comparison with conventional dosage [J]. Leukemia, 2001, 15 (5): 735-741.
- [6] 蔡循,陈国强,陈竺,等. 三氧化二砷治疗肿瘤的机制研究[J]. 肿瘤, 2001, 21 (2): 142-144.
- [7] 张华,罗荣城,伍婧. 索拉非尼联合三氧化二砷对肝癌细胞移植瘤和血管生成抑制作用的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(8): 578-582.
- [8] Gao YH, Zhang HP, Yang SM, et al. Inactivation of Akt by arsenic trioxide induces cell death via mitochondrial-mediated apoptotic signaling in SGC-7901 human gastric cancer cells[J]. Oncol Rep, 2014, 31(4): 1645-1652.
- [9] Chen P, Wu JY, Huang HF, et al. The effect to IL-3Ralpha, downstream PI3k/Akt signaling of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in NB4 cells[J]. Pharmazie, 2014, 69(4): 297-300.
- [10] Hu J, Liu YF, Wu CF, et al. Long-term efficacy and safety of all-trans retinoic acid/arsenic trioxide-based therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(9): 3342-3347.
- [11] Ma Y, Wu Y, Shen Z, et al. Is allogeneic transplantation really the best treatment for FLT3/ITD-positive acute myeloid leukemia? A systematic review [J]. Clin Transplant, 2015, 29 (2): 149-160.

(收稿日期:2015-01-11)

(本文编辑:王叶青)