

三氧化二砷联合双氢青蒿素对 THP-1 细胞增殖及凋亡的影响

赵丽凤, 李晓强, 任汝静, 刘丽*, 谭余庆*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 研究三氧化二砷联合双氢青蒿素对人急性单核细胞白血病(AML)细胞株 THP-1 细胞增殖、周期及凋亡的影响并探究其作用机制。**方法:** 采用噻唑蓝(MTT)比色法检测三氧化二砷、双氢青蒿素、三氧化二砷联合双氢青蒿素对 THP-1 细胞增殖的影响, 流式细胞术 AnnexinV/碘化丙啶(PI)双染实验检测细胞周期和凋亡的变化, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), 裂解半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3), B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达, 在高内涵显微镜下观察药物作用后细胞形态的变化。**结果:** 与空白组比较, 不同浓度的三氧化二砷、双氢青蒿素对 THP-1 细胞的增殖均具有显著抑制作用($P<0.01$), 且成剂量和时间依赖性; 作用 48 h, 与同等剂量的三氧化二砷或双氢青蒿素单独应用比较, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氧化二砷与 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 双氢青蒿素联合应用对 THP-1 细胞增殖的抑制作用显著增强($P<0.01$), 且细胞阻滞在 G_1 期($P<0.01$), 并显著下调 Bcl-2 和 Caspase-3 的表达($P<0.01$), 同时明显上调 cleaved Caspase-3 的表达水平($P<0.05$)。**结论:** 三氧化二砷联合双氢青蒿素对 THP-1 细胞具有明显抑制增殖和诱导凋亡的作用, 其作用机制可能与阻滞细胞 G_1 期, 下调 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达, 上调 cleaved Caspase-3 蛋白表达有关。

[关键词] 急性单核细胞白血病; 三氧化二砷; 双氢青蒿素; THP-1 细胞; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R2-0; R289; R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)17-0042-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201737

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200630.1355.002.html>

[网络出版日期] 2020-6-30 15:22

Effect of Arsenic Trioxide Combined with Dihydroartemisinin on THP-1 Cells Proliferation and Apoptosis

ZHAO Li-feng, LI Xiao-qiang, REN Ru-jing, LIU Li*, TAN Yu-qing*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of arsenic trioxide combined with dihydroartemisinin on proliferation, cell cycle, and apoptosis of THP-1 cells, and explore the mechanism. **Method:** The thiazolyl blue (MTT) method was applied to detect the effect of different concentrations of arsenic trioxide, dihydroartemisinin and arsenic trioxide combined with dihydroartemisinin on the proliferation of THP-1 cells. Annexin V/propidium iodide (PI) assay was used to detect the change of THP-1 cell cycle and apoptosis. Western blot was performed to assess the expression of cysteine protease-3 (Caspase-3), cleaved Caspase-3, B-lymphocytoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax). The changes of cell morphology were observed under high intension microscope. **Result:** Compared with blank group, arsenic trioxide and dihydroartemisinin both exhibited obvious antiproliferative effect on the human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in time-dose dependence ($P<0.01$). After 48 h, compared with the same dose of arsenic trioxide or that of dihydroartemisinin alone, the inhibition effect of $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ arsenic trioxide combined with $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

[收稿日期] 20200204(004)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-YQ-054)

[第一作者] 赵丽凤, 在读硕士, 从事中医药抗白血病研究, E-mail: 1585741203@qq.com

[通信作者] * 谭余庆, 研究员, 从事中医药抗白血病研究, E-mail: yqtan@icmm. ac. cn;

* 刘丽, 助理研究员, 从事中医药抗白血病研究, E-mail: lliu1990@icmm. ac. cn

dihydroartemisinin on proliferation of THP-1 cells was significantly stronger ($P < 0.01$). Compared with the control group, arsenic trioxide combined with dihydroartemisinin significantly arrested the cells in G_1 phase ($P < 0.01$), induced the downregulation of Caspase-3 and Bcl-2 ($P < 0.01$) and upregulation of cleaved Caspase-3 significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Arsenic trioxide combined with dihydroartemisinin can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of THP-1 cells. The possible mechanism may be related to arrest the cells in G_1 phase, reduce the expression of Caspase-3 and Bcl-2, increase the expression of cleaved Caspase-3.

[Key words] acute monocyte leukemia (AML); arsenic trioxide (As_2O_3); dihydroartemisinin (DHA); THP-1 cell line; proliferation; apoptosis

急性单核细胞白血病(AML)是一种严重的异质性恶性肿瘤,20%的AML患者为儿童^[1],成人AML的年发病率为(3~4)/10万^[2-3]。目前AML的治疗主要采用化疗、放疗、同种异体造血细胞移植、干细胞移植等方法^[2]。虽然部分AML患者预后有了很大的改善,但AML仍有较高的复发率和较低的生存率,其中AML患者的5年生存率只有21.4%,而75岁以上的老年患者的5年生存率只有1%~2%^[4-6]。考虑到AML的高复发率和低生存率,放化疗药物毒副作用大,干细胞移植要求高、排斥反应大等临床特点,寻找更为安全、有效、可行性高的药物成为急需解决的问题。

三氧化二砷(As_2O_3)是用于急性早幼粒细胞白血病(APL)的一线化疗药物^[7]。然而,单用 As_2O_3 治疗AML的效果较差^[8-9]。近期的许多研究表明, As_2O_3 与其他药物联合应用对AML,儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)的治疗效果优于单用 As_2O_3 的疗效^[10]。因此,为使 As_2O_3 在治疗AML方面发挥更好的疗效,寻找与 As_2O_3 联合应用具有明显增效作用的药物或化合物显得尤为重要。双氢青蒿素(DHA)是青蒿素的一种活性衍生物,以其抗疟活性而闻名,与青蒿素的其他衍生物相比,DHA具有更强的抗肿瘤活性,可以选择性地杀死肿瘤细胞,且其有效剂量对正常细胞未产生明显的毒性和副作用^[11-12]。DHA已被证明具有抑制胰腺癌^[13]、胶质瘤^[14]、肺癌^[15]和乳腺癌^[16]等的作用。近年研究表明,DHA能够诱导K562, THP-1, HL-60等白血病细胞凋亡^[17-19]。目前 As_2O_3 联合DHA对AML的研究尚未见报告。本研究拟采用 As_2O_3 联合DHA干预THP-1细胞,观察其对AML细胞的增殖和凋亡效应的影响,旨在为AML的临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人急性单核细胞白血病细胞株 THP-1, 购于中国科学院上海细胞库(编号为 SCSP-567)。

1.2 药物及试剂 As_2O_3 (中国医药集团总公司,批号20050908);DHA(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号D1613085);二甲基亚砷(DMSO),青-链霉素混合液,噻唑蓝(MTT),磷酸盐缓冲液(PBS),十二烷基硫酸钠(SDS),0.4%台盼蓝染液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为1213C0329, 20180418, 804W0516, 20191019, 1105P031, 20180409);RPMI 1640培养基(美国HyClone公司,批号AD19952265); β -巯基乙醇(赛默飞世尔科技公司,批号1880936);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号11012-8611);碘化丙啶/核酸核酶染色溶液(PI/RNase Staining Buffer),FITC偶联Annexin-V凋亡检测试剂盒(美国Becton-Dickinson公司,批号分别为8074697,8072965);半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),裂解半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体,辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为8,21,5,10,26); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Sigma公司,批号104M4802V);其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 BP211D型1/1万天平(德国Sartorius公司);BDS400型倒置显微镜(中国Opetec公司);SC-3610型低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);HF212型二氧化碳培养箱(上海力申科学仪器有限公司);YT-CJ-1N型超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司);Multiskan FC型酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];TS-1型水平脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);LDZF-75L-11型立式高压蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);KQ-100E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FACS Canto II 流式细胞仪(美国Becton-Dickinson公司);ChemiDoc™型MP Imaging System(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 药物及试剂配制 As_2O_3 溶液配置:将购买的化合物溶解于 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠中,加入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸调 pH 至 7.0,再加入生理盐水将其稀释成浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚砷酸盐溶液,滤过除菌, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。临用前取少量亚砷酸盐溶液,用 RPMI 1640 培养基稀释成所需浓度。DHA 溶液配置,将购买的化合物溶解于 DMSO,配制成浓度为 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DHA 浓溶液,滤过除菌, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。临用前取适量 DHA 浓溶液,用 RPMI 1640 培养基稀释成所需浓度。

2.2 细胞培养 将 THP-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清, 1% 青-链霉素混合液 ($100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素) 和 $0.05\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 β -巯基乙醇的 RPMI 1640 培养基中,培养于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中。根据细胞生长情况,每 2~3 d 半换液法传代 1 次。

2.3 MTT 比色法检测细胞增殖 收集处于对数生长期的 THP-1 细胞,以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板内,每孔 $150\text{ }\mu\text{L}$,四周用无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 填充,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 24 h。用 $50\text{ }\mu\text{L}$ 不同浓度的药物处理细胞,每组设 6 个复孔。48 h 后离心,弃上清,每孔加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液 $20\text{ }\mu\text{L}$,继续培养 4 h。每孔加入 10% SDS $100\text{ }\mu\text{L}$ 过夜,在酶标仪 570 nm 处测量各孔吸光度 A 。实验重复 3 次。计算细胞增殖抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50})。细胞增殖抑制率 $= (1 - A_{570\text{ nm 给药组}} / A_{570\text{ nm 空白组}}) \times 100\%$ 。

2.4 细胞分组及给药 将细胞分为空白组, As_2O_3 组, DHA 组, As_2O_3 联合 DHA 组。 As_2O_3 组以 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As_2O_3 进行干预, DHA 组以 $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DHA 进行干预, As_2O_3 联合 DHA 组以 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As_2O_3 及 $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DHA 进行干预。

2.5 细胞形态观察 取对数生长期的细胞,以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板内,每孔终体积为 1 mL ,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中孵育 24 h。按照 2.4 项下细胞分组及给药方式干预,48 h 后,置于高内涵显微镜下观察并拍照。

2.6 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡 取对数生长期的细胞,以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板内,每孔终体积为 1 mL ,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中孵育 24 h。按照 2.4 项下细胞分组及给药方式干预,每组设 3 个复孔。48 h 后,收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,用 $1\times$ Binding buffer $100\text{ }\mu\text{L}$ 重悬细胞,加入

FITC Annexin V $5\text{ }\mu\text{L}$ 孵育 10 min,加入 PI $5\text{ }\mu\text{L}$ 。室温避光孵育 5 min。1 h 内上流式细胞仪检测。

2.7 PI 单染法检测细胞周期 取对数生长期的细胞,以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板内,每孔终体积为 1 mL ,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中孵育 24 h。按照 2.4 项下细胞分组及药物干预,每组设 3 个复孔。48 h 后用 PBS 洗涤 1 次,重悬细胞,置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 固定 20 min。逐滴滴入预冷的 75% 乙醇,置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 固定 24 h。加入 PI/RNase Staining Buffer $500\text{ }\mu\text{L}$,上流式细胞仪检测。

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Caspase-3, cleaved Caspase-3, Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 取对数生长期的细胞,以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板内,每孔终体积为 1 mL ,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中孵育 24 h。按照 2.4 项下细胞分组及给药方式干预,每组设 3 个复孔。48 h 后,收集细胞,提取蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 12% 的 SDS-PAGE 分离后,转移到 NC 膜上,用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h,加入 Caspase-3, cleaved Caspase-3, Bax, Bcl-2, β -actin 一抗 ($1:1\ 000$), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,洗膜后加入二抗 ($1:2\ 000$),室温孵育 1 h,洗膜后使用增强化学发光 (ECL) 检测试剂显影,置于凝胶成像系统内曝光。用 Image J 软件采集条带灰度值,取目的条带和内参条带灰度值的比值作为蛋白表达量。

2.9 统计学分析 利 SPSS 19.0 软件进行数据处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度的 As_2O_3 对 THP-1 细胞增殖的抑制作用 与空白组比较,随着 As_2O_3 浓度 ($1, 2, 4, 8, 16, 32, 64\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的增加,THP-1 细胞的增殖抑制率显著升高 ($P < 0.01$),且呈剂量依赖性,半数抑制浓度为 $(1.85 \pm 0.06)\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表 1。

3.2 不同浓度的 DHA 对 THP-1 细胞增殖的抑制作用 与空白组比较,随着 DHA 浓度 ($1, 2, 4, 16, 64, 256, 512\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的增加,THP-1 细胞的增殖抑制率显著升高 ($P < 0.01$),且呈剂量依赖性,半数抑制浓度为 $(6.35 \pm 0.93)\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表 2。

3.3 As_2O_3 联合 DHA 对 THP-1 细胞增殖的抑制作用 与空白组比较,各给药组细胞增殖均受到明显的抑制作用 ($P < 0.01$);分别与相同浓度的 As_2O_3 , DHA 单独作用比较, As_2O_3 联合 DHA 对 THP-1 细胞

表1 As₂O₃对THP-1细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of arsenic trioxide on growth of THP-1 cell line ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | A | 抑制率/% |
|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|------------|
| 空白 | - | 2.001±0.069 | - |
| As ₂ O ₃ | 1 | 1.330±0.032 ¹⁾ | 33.37±3.30 |
| | 2 | 0.657±0.030 ¹⁾ | 67.16±1.77 |
| | 4 | 0.660±0.059 ¹⁾ | 67.03±2.88 |
| | 8 | 0.251±0.028 ¹⁾ | 87.45±1.42 |
| | 16 | 0.082±0.004 ¹⁾ | 95.92±0.21 |
| | 32 | 0.077±0.006 ¹⁾ | 96.15±0.35 |
| | 64 | 0.081±0.005 ¹⁾ | 95.94±0.38 |

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ (表2同)。

表2 DHA对THP-1细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of dihydroartemisinin on growth of THP-1 cell line ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | A | 抑制率/% |
|-----|---------------------------------------|---------------------------|------------|
| 空白 | - | 1.597±0.145 | - |
| DHA | 1 | 1.142±0.066 ¹⁾ | 27.92±4.55 |
| | 2 | 0.859±0.088 ¹⁾ | 45.77±2.81 |
| | 4 | 0.819±0.092 ¹⁾ | 48.18±5.09 |
| | 16 | 0.650±0.062 ¹⁾ | 59.05±4.85 |
| | 64 | 0.322±0.014 ¹⁾ | 79.72±2.06 |
| | 256 | 0.130±0.010 ¹⁾ | 91.82±0.87 |
| | 512 | 0.115±0.006 ¹⁾ | 92.77±0.82 |

的抑制率显著升高($P<0.01$)。见表3。

表3 As₂O₃联合DHA对THP-1细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

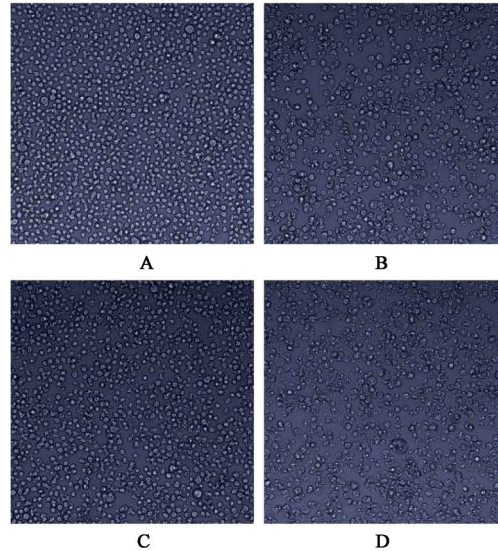
Table 3 Effect of arsenic trioxide combined with dihydroartemisinin on growth of THP-1 cell line($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | A | 抑制率/% |
|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------|
| 空白 | - | 1.468±0.170 | - |
| As ₂ O ₃ | 1 | 0.992±0.097 ¹⁾ | 31.93±7.58 |
| | 2 | 0.688±0.061 ¹⁾ | 52.52±7.62 |
| DHA | 1 | 0.962±0.136 ¹⁾ | 33.68±12.47 |
| | 2 | 0.744±0.213 ¹⁾ | 48.25±17.13 |
| As ₂ O ₃ 联合DHA | 1+1 | 0.288±0.042 ^{1,2,3)} | 80.05±4.35 |
| | 1+2 | 0.218±0.013 ^{1,2,3)} | 84.94±1.90 |
| | 2+1 | 0.230±0.007 ^{1,2,3)} | 84.16±2.00 |
| | 2+2 | 0.163±0.003 ^{1,2,3)} | 88.79±1.39 |

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与同浓度As₂O₃组比较²⁾ $P<0.01$;与同浓度DHA组比较³⁾ $P<0.01$ 。

3.4 As₂O₃联合DHA对细胞形态的影响 与空白组比较,各给药组THP-1细胞形态发生明显改变,生长状态变差,细胞间距变大,部分细胞出现皱缩,

培养基中细胞碎片增多;分别与As₂O₃组,DHA组比较,As₂O₃联合DHA组的细胞生长状态更差,细胞形状不规则,大部分细胞出现明显皱缩,相同视野面积下细胞数量更少,培养基中细胞碎片也更多。见图1。



A.空白组;B.As₂O₃组;C.DHA组;D.As₂O₃联合DHA组(图2同)。

图1 As₂O₃联合DHA对THP-1细胞形态的影响(倒置显微镜,×400)

Fig. 1 Arsenic trioxide combined with dihydroartemisinin change the morphology of THP-1 cells(inverted microscope, × 400)

3.5 As₂O₃联合DHA对细胞周期的影响 与空白组比较,各给药组细胞G₂和S期细胞明显减少,G₁期细胞比例明显增加($P<0.05$);分别与As₂O₃,DHA组比较,As₂O₃联合DHA组的G₁期细胞比例显著增加($P<0.01$),S期细胞显著减少($P<0.01$)。见表4。

3.6 As₂O₃联合DHA对细胞凋亡的影响 与空白组比较,各给药组细胞早期凋亡和晚期凋亡比例均增加($P<0.05, P<0.01$);分别与As₂O₃组和DHA组比较,As₂O₃联合DHA组细胞凋亡比例明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表5。

3.7 As₂O₃联合DHA对THP-1细胞相关凋亡蛋白表达量的影响 与空白组比较,各给药组Bcl-2和Caspase-3蛋白表达量均明显下调($P<0.05, P<0.01$),cleaved Caspase-3蛋白表达量明显上调($P<0.05, P<0.01$);与As₂O₃组比较,As₂O₃联合DHA组Caspase-3和Bcl-2蛋白表达量明显下调($P<0.05, P<0.01$);与DHA组比较,As₂O₃联合DHA组cleaved Caspase-3蛋白表达量明显上调($P<0.05$),Caspase-3和Bcl-2蛋白表达量明显下调($P<0.05, P<0.01$)。见图2,表6。

表 4 As₂O₃联合 DHA 对 THP-1 细胞周期的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | G ₁ | S | G ₂ |
|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 空白 | - | 61.79±2.38 | 31.22±1.47 | 6.98±1.37 |
| As ₂ O ₃ | 1 | 66.80±0.60 ¹⁾ | 30.13±1.09 | 3.06±0.85 ¹⁾ |
| DHA | 2 | 64.79±3.38 ²⁾ | 31.95±3.16 | 3.26±0.55 ¹⁾ |
| As ₂ O ₃ 联合 DHA | 1+2 | 85.75±1.27 ^{2,3,6)} | 14.26±1.27 ^{2,3,6)} | 0 ^{2,4,6)} |

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与 As₂O₃组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;与 DHA 组比较⁵⁾P<0.05,⁶⁾P<0.01(表 6 同)。

表 5 As₂O₃联合 DHA 对 THP-1 细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 正常细胞 | 早期凋亡 | 晚期凋亡 | 坏死细胞 |
|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 空白 | - | 73.93±2.21 | 10.97±0.55 | 13.17±1.55 | 1.90±0.10 |
| As ₂ O ₃ | 1 | 60.93±0.42 ²⁾ | 14.07±0.81 ¹⁾ | 23.57±0.58 ²⁾ | 1.50±0.10 ¹⁾ |
| DHA | 2 | 33.30±1.84 ²⁾ | 14.60±0.44 ²⁾ | 46.37±1.79 ²⁾ | 5.80±1.40 ¹⁾ |
| As ₂ O ₃ 联合 DHA | 1+2 | 6.97±1.23 ^{2,3,4)} | 28.67±0.91 ^{2,3,4)} | 62.53±2.42 ^{2,3,4)} | 1.83±0.91 ⁵⁾ |

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与 As₂O₃组比较³⁾P<0.01;与 DHA 组比较⁴⁾P<0.05,⁵⁾P<0.01。

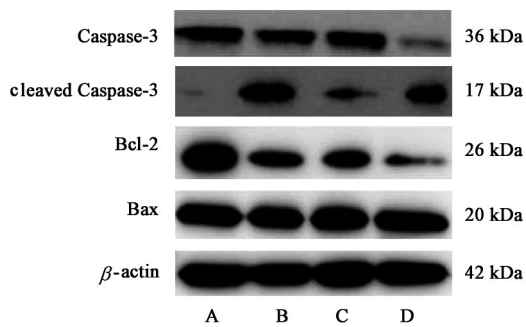


图 2 各组 THP-1 细胞相关凋亡蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of apoptosis-related proteins in each group

表 6 As₂O₃联合 DHA 对相关凋亡蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Bax/ β -actin | Bcl-2/ β -actin | cleaved Caspase-3/ β -actin | Caspase-3/ β -actin |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 空白 | - | 0.70±0.07 | 0.82±0.07 | 1.62±0.44 | 4.23±0.20 |
| As ₂ O ₃ | 1 | 0.64±0.07 | 0.53±0.11 ¹⁾ | 4.97±1.50 ¹⁾ | 1.24±0.05 ²⁾ |
| DHA | 2 | 0.67±0.06 | 0.55±0.10 ¹⁾ | 2.54±1.08 | 1.08±0.07 ²⁾ |
| As ₂ O ₃ 联合 DHA | 1+2 | 0.67±0.07 | 0.24±0.07 ^{2,3,5)} | 6.63±1.03 ^{2,5)} | 0.18±0.01 ^{2,4,6)} |

细胞凋亡受体多种凋亡相关蛋白酶的调节^[24]。Caspase 是蛋白水解酶家族,其功能是通过诱导细胞程序性死亡而介导细胞发生凋亡^[25]。Caspase-3 是一种细胞内蛋白酶,被认为是细胞凋亡程序过程中的最终执行者^[26],Caspase-3 剪切体 cleaved Caspase-3 也被认为是细胞凋亡的标志性蛋白^[27]。检测 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平可有效评估细胞凋亡的发生^[28]。Bcl-2 基因家族,是目前公认的细胞凋亡调节基因,包括 Bcl-

4 讨论

AML 是一种常见的急性白血病类型,以骨髓和外周血中白细胞和单核细胞数量增多为特征,进展快,死亡率高^[20-21],但其具体的发病机制尚不清楚。据报道,肿瘤的发生和发展与细胞凋亡机制失常密切相关^[22]。细胞凋亡是机体的正常细胞受到生理和病理刺激后出现的一种自发的死亡过程^[23]。当凋亡机制失调时,会引起细胞异常增殖甚至癌症的发生。因此,寻找可诱导 AML 细胞凋亡的药物是治疗 AML 并阻止其进一步发展的关键。

2 等抗凋亡基因和 Bax 等促凋亡基因^[29-31]。当细胞发生凋亡时,Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达量发生改变;而抗凋亡蛋白 Bcl-2 通过影响 Caspase-3 来控制细胞凋亡。此外,细胞周期,又称为细胞增殖周期,是指细胞从上一次分裂结束到下一次分裂完成所经历的全过程^[32]。根据细胞时相特点,细胞周期被划分为 G₁ 期(DNA 合成前期),S 期(DNA 合成期),G₂ 期(DNA 合成后期)和 M 期(有丝分裂期)4 个阶段^[33]。其中,G₁ 期被认为是启动细胞周期的关键时期,处

于该期的细胞发生高度分化,失去增殖能力,因此,处于该期细胞数量越多,疾病的恶性程度越低^[34]。肿瘤细胞的生长取决于肿瘤细胞增殖与凋亡之间的平衡状态,化疗药物就是通过诱导细胞周期阻滞、促进细胞凋亡从而达到抑制肿瘤的作用^[35-36]。

本研究显示 As₂O₃, DHA 对 THP-1 细胞株的活性具有抑制效果,且随着浓度的增加对 THP-1 细胞增殖的抑制作用增强,As₂O₃ 联合 DHA 对 THP-1 细胞的增殖抑制作用明显优于 As₂O₃ 或 DHA 单独应用。同时,As₂O₃ 联合 DHA 使 THP-1 细胞 G₁ 期比例明显增加,下调 Caspase-3 和 Bcl-2 的蛋白表达,上调 cleaved Caspase-3 蛋白的表达。因此,As₂O₃ 联合 DHA 具有显著抑制 THP-1 细胞增殖的效果,且该作用可能是通过下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 诱导 Caspase-3 所介导的细胞凋亡途径及改变细胞周期来实现的。

[参考文献]

- [1] KOLB E A, MESHINCHI S. Acute myeloid leukemia in children and adolescents: identification of new molecular targets brings promise of new therapies[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2015, doi:10.1182/asheducation-2015.1.507.
- [2] DÖHNER H, WEISDORF D J, BLOOMFIELD C D. Acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2015, 373: 1136-1152.
- [3] GUPTA V, TALLMAN M S, WEISDORF D J. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns[J]. Blood, 2011, 117(8):2307-2318.
- [4] PULTE D, GONDOS A, BRENNER H. Expected long-term survival of patients diagnosed with acute myeloblastic leukemia during 2006-2010 [J]. Ann Oncol, 2010, 21(2):335-341.
- [5] 岳寒,刘丽英,王小倩. 基质细胞共培养对急性髓系白血病细胞耐药性影响及机制研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(2):382-386.
- [6] SIVEEN K S, UDDIN S, MOHAMMAD R M. Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1):13.
- [7] GHAVAMZADEH A, ALIMOGHADDAM K, ROSTAMI S, et al. Phase II study of single-agent arsenic trioxide for the front-line therapy of acute promyelocytic leukemia [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(20):2753-2757.
- [8] DOUER D, TALLMAN M S. Arsenic trioxide: new clinical experience with an old medication in hematologic malignancies [J]. Clin Oncol, 2005, 23(10):2396-2410.
- [9] PARMAR S, RUNDHAUGEN L M, BOEHLKE L, et al. Phase II trial of arsenic trioxide in relapsed and refractory acute myeloid leukemia, secondary leukemia and/or newly diagnosed patients at least 65 years old[J]. Leuk Res, 2004, 28(9):909-919.
- [10] SHINICHIRO T. Combination therapy with arsenic trioxide for hematological malignancies [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2010, 10(6):504-510.
- [11] ZHANG D, WANG Q, ZHU T, et al. RACK1 promotes the proliferation of THP1 acute myeloid leukemia cells [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 384:197-202.
- [12] ZENG C, WANG W, YU X, et al. Pathways related to PMA-differentiated THP1 human monocytic leukemia cells revealed by RNA-Seq [J]. Sci China Life Sci, 2015, 58:1282-1287.
- [13] CHEN H, SUN B, PAN S, et al. Dihydroartemisinin inhibits growth of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Anticancer Drugs, 2009, 20(2):131-140.
- [14] LEMKE D, PLEDL H W, ZORN M, et al. Slowing down glioblastoma progression in mice by running or the antimalarial drug dihydroartemisinin? Induction of oxidative stress in murine glioblastoma therapy [J]. Oncotarget, 2016, 7(35):56713-56725.
- [15] TONG Y, LIU Y, ZHENG H, et al. Artemisinin and its derivatives can significantly inhibit lung tumorigenesis and tumor metastasis through Wnt/beta-catenin signaling [J]. Oncotarget, 2016, 7(21):31413-31428.
- [16] FENG M X, HONG J X, WANG Q, et al. Dihydroartemisinin prevents breast cancer-induced osteolysis via inhibiting both breast cancer cells and osteoclasts [J]. Sci Rep, 2016, 6:19074.
- [17] WANG Z, HU W, ZHANG J L, et al. Dihydroartemisinin induces autophagy and inhibits the growth of iron-loaded human myeloid leukemia K562 cells via ROS toxicity [J]. Febs Open Bio, 2012, 2(1):103-112.
- [18] CAO J T, MO H M, WANG Y, et al. Dihydroartemisinin-induced apoptosis in human acute monocytic leukemia cells [J]. Oncol Lett, 2018, 15(3):3178-3184.
- [19] REN X, LIU J, HU L, et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits the proliferation of HEP2 cells by regulating Stat3/Plk1 pathway and inducing S phase arrest [J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(10):1689-1693.
- [20] GOSWAMI M, HOURIGAN C S. Novel antigen targets for immunotherapy of acute myeloid leukemia [J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(3):296-303.

- [21] MANZOTTI G, PARENTI S, AMOROTTI G, et al. Monocyte macrophage differentiation of acute myeloid leukemia cell lines by small molecules identified through interrogation of the Connectivity Map database [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(16):2578-2589.
- [22] WONG R S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30(1):87.
- [23] CAO W, MO K, WEI S, et al. Effects of rosmarinic acid on immunoregulatory activity and hepatocellular carcinoma cell apoptosis in H22 tumor-bearing mice [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2019, 23(6):501-508.
- [24] 肖婷婷, 罗敏, 曾星, 等. 甘草酸通过RNA结合蛋白HuR调控p21表达对IEC-6细胞抗凋亡作用的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(12):85-89.
- [25] 朱杨壮壮, 张飞, 焦肖宁, 等. 芦荟苦素对非小细胞肺癌A549细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(14):13-18.
- [26] LAURA L, CLAUDIA C, ADALBERTO M. Caspase-3 mediated cell death in the normal development of the mammalian cerebellum [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12):3999.
- [27] LANG W J, ZHU J Y, CHEN F Y, et al. EVI-1 modulates arsenic trioxide induced apoptosis through JNK signalling pathway in leukemia cells [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 374(1):140-151.
- [28] PAULSSON J F, SCHULTZ S W, MARTIN K, et al. Real-time monitoring of apoptosis by Caspase-3-like protease induced FRET reduction triggered by amyloid aggregation [J]. *Exp Diabetes Res*, 2008, doi: 10.1155/2008/865850.
- [29] CATZ S D, JOHNSON J L. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2001, 20(50):7342-7351.
- [30] KWON O S, HONG S K, KWON S J, et al. BCL2 induced by LAMTOR3/MAPK is a druggable target of chemoradioresistance in mesenchymal lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 403:48-58.
- [31] ZHANG Z W, MIAO L, SUN W Z, et al. Wentilactone B from *Aspergillus wentii* induces apoptosis and inhibits proliferation and migration of human hepatoma SMMC-7721 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(11):1964-1971.
- [32] 王建枝, 钱睿哲. 病理生理学 [M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018:141.
- [33] 姜浩力, 郭威, 袁善有, 等. PI3K抑制剂TGX-221对人骨肉瘤细胞增殖、周期及凋亡的影响 [J]. *局解手术学杂志*, 2020, 29(2):93-97.
- [34] 符芳姿, 许振胜. 槲皮素对人骨肉瘤MG-63细胞周期及自噬流的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2019, 36(6):885-888.
- [35] CHEN S H, LUO T W, YU Q, et al. Isoorientin plays an important role in alleviating Cadmium-induced DNA damage and G₀/G₁ cell cycle arrest [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 187:109851.
- [36] 王健, 李健, 王勇, 等. 黄芩素通过抑制PI3K/AKT/mTOR通路诱导膀胱癌细胞凋亡 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2019, 57(9):74-82.

[责任编辑 孙丛丛]