

· 基础研究 ·

热疗联合阿霉素对 K562/A02 细胞株 凋亡及 Bcl-2 表达的影响

魏红梅 郭坤元 梅家转 常红 宋朝阳

【摘要】目的 观察热疗联合阿霉素对耐药慢性髓系白血病细胞株 K562/A02 的体外增殖抑制作用、凋亡及 Bcl-2 表达的影响。**方法** 采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT 法) 确定阿霉素的工作浓度, 以该浓度进行化疗或与热疗联合治疗, 分别选择温度 40、41 和 42℃, 体外作用于 K562/A02。采用 MTT 法检测对肿瘤细胞增殖的抑制作用; 流式细胞仪检测细胞凋亡及 Bcl-2 表达。观察热疗联合阿霉素的抗肿瘤效果。**结果** 作用 48 h 后 IC₅₀ 为 53 μg/ml, 以此为实验的工作浓度。单纯热疗 60 min 对 K562/A02 细胞有抑制作用 ($P < 0.01$), 并随温度增高而增强; 单纯化疗对 K562/A02 细胞也有抑制作用; 各热化疗组对 K562/A02 均有明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 随着温度的增高而增强。流式细胞仪检测细胞凋亡及 Bcl-2 的表达, 热疗组、化疗组及热化疗组的细胞凋亡率均较对照组显著升高, 各组之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Bcl-2 蛋白的表达下降, 各组之间的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 热疗联合阿霉素能增强对 K562/A02 细胞的体外抑制作用, 提高肿瘤细胞的凋亡率, 下调 Bcl-2 蛋白的表达。

【关键词】 阿霉素; 热疗; K562/A02 细胞株; 凋亡; Bcl-2

Apoptosis and Bcl-2 expression of cell line K562/A02 treated with adriamycin in combination with hyperthermia WEI Hong-mei, GUO Kun-yuan, MEI Jia-zhuan, CHANG Hong, SONG Chao-yang. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

【Abstract】Objective To investigate the inhibitory effect of adriamycin in combination with hyperthermia on apoptosis and bcl-2 expression in the chronic leukemic cell line K562/A02 in vitro. **Methods** The working concentration of adriamycin against K562/A02 determined by using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to treat the chronic leukemic cell line K562/A02 in vitro alone or in combination with hyperthermia induced using a hot water bath at 40, 41 or 42℃. The inhibitory effect was evaluated by MTT assay. The apoptosis rates and bcl-2 expression of K562/A02 were determined by flow cytometry. **Results** The working concentration of adriamycin in the study was defined as its 50% inhibition concentration (IC₅₀). A 60 min session of hyperthermia at 40℃, 41℃ or 42℃ was associated with significant growth inhibition of the cell line K562/A02. Adriamycin chemotherapy alone and with hyperthermia significantly inhibited the growth of K562/A02. All treatments significantly increased apoptosis rates and down-regulated bcl-2 expression of the K562/A02 cell line. **Conclusion** Adriamycin chemotherapy combined with 60 min sessions of hyperthermia showed significant suppression effect on K562/A02 cell proliferation. The treatment can increase apoptosis rates and down-regulate bcl-2 expression.

【Key words】 Adriamycin; Hyperthermia; K562/A02; Apoptosis; Bcl-2

随着热生物学的发展, 热疗已成为继手术、化疗、放疗、免疫治疗之后的又一种治疗肿瘤的新方法。本研究使用人源耐药慢性髓系白血病细胞株 K562/A02, 观察阿霉素 (adriamycin, ADM) 与热疗联合对白血病细胞株体外生长的影响, 为临床热化疗联合应用治疗耐药血液病提供实验依据。

材料与方法

一、材料

1. 细胞株: 人耐药慢性髓系白血病细胞株 K562/A02 为广州医学院蛇毒研究所馈赠, 由我科实验室传代

保存。于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养。

2. 主要试剂: RPMI-1640 培养基是 GIBCO 公司产品; 新生胎牛血清为杭州四季青生物公司生产; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自宝泰克公司; ADM 购自深圳万乐药业有限公司; 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 购自天津化学试剂厂。

3. 主要仪器: ELX800 全自动酶标仪、倒置显微镜、电热恒温水浴箱。

二、方法

1. 实验分组: 实验设对照组 (单纯培养)、化疗组、热疗组和热化疗组。其中, 热疗组和热化疗组根据所选择温度 40、41 及 42℃ 各设 3 组, 共 8 组。

2. 热疗方法:电热恒温水浴箱中加热 K562/AO2 细胞 60 min,温度变化为 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。

3. 药物工作浓度的确定及处理方法:ADM 设 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ 5 个浓度组,每组设 3 个复孔,以 MTT 法测定细胞增殖抑制率,以 48 h、IC₅₀ 的药物浓度作为实验的工作浓度。IC₅₀ 的数值按 IC₅₀ 计算软件获得。

取生长状态好的、对数生长期的 K562/AO2 细胞,用 RPMI-1640 培养液配成细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 的单细胞悬液,接种于 50 ml 的培养瓶中,阿霉素按照上述工作浓度分别加入化疗组及热化疗组,对照组及化疗组放在培养箱中继续培养;热疗组及热化疗组即刻放入电热恒温水浴箱中按照不同温度加温 60 min,然后放回培养箱中继续培养,48 h 时检测各项指标。

4. MTT 法测定细胞增殖:48 h 时收集各组的 K562/AO2 细胞接种到 8 个 96 孔板中,每孔 200 μl (10^3 个细胞),每孔加入 MTT 20 μl ,继续培养 4 h;每孔加入 MTT 20 μl ,继续培养 4 h;2 000 r/min,离心半径 17.5 cm,离心 5 min,吸去培养液,每孔加入 150 μl DMSO,在微型震荡器上震荡 5 min;然后将培养板置于全自动酶标仪上,选 490 nm 为测定波长,测定各孔的 OD 值,计算细胞增殖抑制率。实验重复 3 次。

细胞增殖抑制率 = (对照组 OD 均值 - 实验组 OD 均值) / 对照组 OD 均值 $\times 100\%$

5. 流式细胞仪检测细胞凋亡:48 h 时,收集各组的 K562/AO2 细胞,取对数生长的 K562/AO2 细胞配成单细胞悬液接种于 50 ml 的培养瓶中,每瓶细胞数为 2×10^5 个,分别按分组进行处理后继续培养。48 h 时收集细胞,以冷磷酸缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 遍后,离心半径 7.5 cm,1 000 r/min,离心 5 min。去上清,加入 300 μl DNA 染液(内含碘化丙啶 100 $\mu\text{g/ml}$ 和 RNA 酶 20 u/ml),轻摇细胞悬液后于室温避光保存 30 min。每管加入 400 μl 缓冲液,混合后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,实验重复 3 次。

6. 流式细胞仪检测细胞 Bcl-2 表达:48 h 时,收集对照组、化疗组、热疗组(41°C)及热化疗组(41°C + ADM)的 K562/AO2 细胞,每瓶细胞数为 2×10^5 个,选取 41°C 为实验温度,分别按前分组进行处理后继续培养,48 h 收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,离心,去上清,加入 100 μl 破膜剂及 5 μl 的 FITC 标记细胞内抗体(Bcl-2/FITC)和相应的阴性对照(Mouse IgG1/FITC),于 4°C 冰箱内孵育 20 min, PBS 洗 1 次,离心半径 7.5 cm,1 000 r/min,离心 5 min,去上清,立即用流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

三、统计学分析

采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,数据采用

($\bar{x} \pm s$) 表示及单向方差分析。

结 果

一、ADM 工作浓度的确定

MTT 实验测得 5, 10, 20, 40 及 80 $\mu\text{g/ml}$ 不同浓度的 ADM 作用 K562/AO2 细胞 48 h 的抑制率分别为 $(18.6\% \pm 2.0\%)$, $(26.4 \pm 3.2\%)$, $(34.8 \pm 5.0\%)$, $(42.6 \pm 3.8\%)$ 及 $(58.4 \pm 3.8\%)$ 。ADM 对 K562/AO2 细胞的 IC₅₀ 为 53 $\mu\text{g/ml}$,并以此药物浓度进行各项实验。

二、细胞的抑制率

经 40, 41 及 42°C 单纯热疗 60 min, 48 h 时对热疗组 K562/AO2 细胞均有抑制作用($P < 0.01$);单纯 ADM 组对 K562/AO2 细胞也有一定的抑制作用;热化疗组 3 种温度的细胞抑制率均较热疗组和化疗组显著增高($P < 0.01$); 42°C 的热化疗与 40°C 的热化疗之间的抑制率差异有统计学意义($P < 0.01$), 42 与 41°C 、41 与 40°C 的热化疗组之间的抑制率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

三、流式细胞仪检测凋亡

经 40, 41 及 42°C 热疗后 48 h 后取 K562/AO2 细胞并观测其凋亡情况发现,热疗组及热化疗组细胞凋亡率较对照组有明显升高($P < 0.01$);化疗组与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。热化疗组的细胞凋亡率较单纯热疗及单纯化疗的凋亡率均明显升高($P < 0.01$)。上述结果均随温度的增加而增强。详见表 1。

表 1 48 h 时 ADM 对 K562/AO2 抑制率及凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	抑制率(%)	凋亡率(%)
对照组	—	4.1 ± 0.1
化疗组	45.4 ± 2.0	6.2 ± 0.3
热疗组		
40°C	12.5 ± 4.5	9.7 ± 0.2^c
41°C	22.6 ± 4.8	11.7 ± 0.9^c
42°C	30.8 ± 4.8	20.9 ± 1.5^c
热化疗组		
40°C	55.3 ± 1.2^{ab}	22.0 ± 1.8^{abc}
41°C	60.1 ± 3.9^{ab}	35.4 ± 0.7^{abc}
42°C	68.7 ± 5.0^{ab}	40.5 ± 0.8^{abc}

注:与化疗组比较,^a $P < 0.01$;与热疗组相同温度值比较,^b $P < 0.01$;与对照组比较,^c $P < 0.01$

四、流式细胞仪检测 Bcl-2 的表达

对照组、化疗组及 41°C 下的热疗组和热化疗组的 K562/AO2 细胞 Bcl-2 表达率分别为: $(81.0 \pm 3.6\%)$, $(56.0 \pm 5.3\%)$, $(69.3 \pm 0.6\%)$ 及 $(42.3 \pm 2.5\%)$ 。化疗组、热疗组及热化疗组细胞 Bcl-2 表达率与对照

组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);热化疗组与化疗组及热疗组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。

讨 论

目前,采用热疗和化疗联合治疗实体瘤的国内外研究较多^[1,2]。但关于热化疗治疗恶性血液病的系统报道较少,国内仅丁向东等^[3]报道采用全身热疗治疗 1 例慢性粒细胞白血病——急性粒细胞变性患者(随访 6 月完全缓解),魏红梅等^[4]报道全身热疗治疗恶性血液病 15 例,无 1 例患者出现出血及弥散性血管内凝血的风险,初步显示其有效性和安全性。本研究通过体外细胞毒等实验,观察了热化疗对人耐药慢性髓系白血病细胞株 K562/AO2 的作用,并试图对其机制进行初步探讨。

B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (B cell lymphoma/leukemia 2, Bcl-2) 基因是一种抑制细胞凋亡的基因,在多种肿瘤中表达,尤其在淋巴瘤、白血病等恶性血液病中。目前 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制机制尚不清楚^[5]。关于高温诱发细胞凋亡的发生机制,一方面高温可直接影响细胞结构,另一方面与某些基因异常表达有关。已有证据表明,凋亡抑制基因表达增强或(和)凋亡活化基因受抑是白血病发生的机制之一。Bcl-2 基因是从滤泡性淋巴瘤中分离出来的一种癌基因,该基因的编码产物是 Bcl-2 蛋白,它不像其他致癌基因那样加速细胞分裂、增殖,而是促进细胞生存,延长细胞寿命^[6]。Bcl-2 蛋白异常高表达使细胞获得病态的生存优势,它是化疗所致耐药性形成的内在生物学基础^[7],温热可下调 Bcl-2 蛋白的表达^[8]。

ADM 是肿瘤细胞有丝分裂的非特异性阻滞药物,主要作用机制是在 DNA 复制过程中诱导拓扑异构酶 II (TOPOII) 抑制剂-DNA 断裂复合物的形成,引起细胞死亡或停滞于 S 期、G2 期^[9]。由于 ADM 使大量细胞处于 S 期,S 期对热最敏感^[10],因此热疗联合化疗对肿瘤细胞的杀伤作用增强。有研究报道,高热可导致肿瘤细胞膜的流动性和通透性发生改变,从而导致肿瘤细胞死亡;高热可减少化疗药物所致的细胞 DNA 的修复,从而增加了 DNA 的损伤;热疗可促进化疗药物进入肿瘤细胞,增加肿瘤细胞内的药物浓度^[11];热疗还可促进肿瘤宿主产生免疫反应^[12,13]。动物实验和临床研究也表明^[14-16],正常组织细胞的温度安全界限值是 $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$,不超过 42°C 的全身热疗会对各重要脏器组织造成一定的损伤,如心率增快、烦躁不安、组织水肿及转氨酶轻度升高,但这种损伤是轻微和可逆的。

本实验表明,ADM 与热疗联合较热疗组及化疗组更明显地抑制 K562/AO2 细胞的增殖、促进其凋亡、下调 Bcl-2 蛋白表达水平。热处理后明显提高了耐药的

K562/AO2 对 ADM 的敏感性,加温治疗可能会成为逆转耐药的一种新方法^[17]。具体作用机制尚有待于进一步探讨。上述研究为耐药的慢性白血病的治疗提供了理论基础,但尚需更多的体外实验,为临床应用提供充分的依据。

参 考 文 献

- [1] Richel O, Zum Vorde Sive Vording PJ, Rietbroek R, et al. Phase II study of carboplatin and whole body hyperthermia (WBH) in recurrent and metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2004, 95: 680-685.
- [2] Ismail-Zade RS, Zhavrid EA, Potapnev MP. Whole body hyperthermia in adjuvant therapy of children with renal cell carcinoma. *Pediatr Blood Cancer*, 2005, 44: 679-681.
- [3] 丁向东, 赵鑫, 刘萍. 全身热疗治疗慢性粒细胞白血病-急粒变 1 例. *临床血液学杂志*, 2005, 18: 242.
- [4] 魏红梅, 郭坤元, 尚振川, 等. 全身热疗系统治疗恶性血液病 15 例;加温、测温和控温技术的安全、顺应及有效性观察. *中国临床康复*, 2006, 10: 38-40.
- [5] 向世强, 刘仁刚, 周洁萍, 等. 高温诱导 Hela 细胞凋亡的相关机理的研究. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2004, 13: 427-430.
- [6] Kutschka I, Kofidis T, Chen IY, et al. Adenoviral human Bcl-2 transgene expression attenuates early donor cell death after cardiomyoblast transplantation into ischemic rat hearts. *Circulation*, 2006, 114: 1174-1180.
- [7] 赵晓庆, 李根山, 郭稳捷, 等. Bcl-2 和 Bax 蛋白在急性白血病细胞中的表达及临床意义. *中国当代儿科杂志*, 1999, 1: 193-195.
- [8] He J, Xu H, Yang Y, et al. Neuroprotective effects of olanzapine on methamphetamine-induced neurotoxicity are associated with an inhibition of hyperthermia and prevention of Bcl-2 decrease in rats. *Brain Res*, 2004, 1018: 186-192.
- [9] Tewey KM, Rowe TC, Yang L, et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, 1984, 226: 466-468.
- [10] Valdagni R. International consensus meeting on hyperthermia; Final report. *Int J Hyperthermia*, 1990, 6: 839-877.
- [11] 张洪新, 刘燕, 王执民, 等. 加热对人肝癌细胞 7721/Adm 耐药株阿霉素的增敏作用. *基础医学与临床*, 2001, 21: 432-434.
- [12] 杨维珍, 尉继伟. 热疗对荷 VX₂ 瘤动物细胞因子影响的实验研究. *中华普通外科杂志*, 2005, 20: 591-593.
- [13] 陈雪琴, 马胜林. 肿瘤热疗作用机制研究进展. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27: 562-564.
- [14] 彭楠, 赵彼得. 临床肿瘤热疗. 北京: 人民军医出版社, 2002: 1-95.
- [15] 叶小鸣, 黄文起, 程权永, 等. 体外循环全身热灌注疗法治疗恶性肿瘤 81 例报告. *中国实用外科杂志*, 2006, 26: 51-54.
- [16] Wehner H, Ardenne A, Kaltofen S. Whole-body hyperthermia with water-filtered infrared radiation; technical-physical aspects and clinical experiences. *Int J Hyperthermia*, 2001, 17: 19-30.
- [17] 王执民, 刘国鹏, 樊爱琳, 等. 高温合并化疗对耐药性大鼠肝癌 CRBH-7919 细胞系的协同作用. *第四军医大学学报*, 2002, 23: 1590-1592.

(修回日期: 2006-11-29)

(本文编辑: 熊芝兰)