

维生素 K₃ 增强三氧化二砷诱导多发性骨髓瘤 细胞凋亡的实验研究

邓 姝 沈建平 沈一平 林圣云 胡致平 郑智茵 周郁鸿

(浙江省中医药大学附属第一医院血液科, 浙江省杭州市邮电路 54 号, 310006)

摘要 目的:探讨维生素 K₃ 对三氧化二砷(As₂O₃)诱导人多发性骨髓瘤(MM)细胞株 RPMI 8226 细胞凋亡的作用及生长抑制。方法:采用四甲基噻唑氮蓝比色法检测 As₂O₃ 联合维生素 K₃ 对人多发性骨髓瘤(MM)细胞株 RPMI 8226 细胞生长抑制作用;流式细胞术检测 As₂O₃ 联合维生素 K₃ 对 RPMI8226 细胞周期和凋亡率的影响。结果:单用 As₂O₃ 对 RPMI 8226 细胞的生长有抑制作用,其作用呈时间和剂量依赖性;与单用 As₂O₃ 相比,As₂O₃ 联合维生素 K₃ 作用于 RPMI 8226 细胞 48h 后,细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$),G₀/G₁ 期细胞比例升高,S 期减低,并有凋亡峰。结论:维生素 K₃ 可以增强 As₂O₃ 对 RPMI8226 细胞诱导凋亡作用。

关键词 维生素 K₃;三氧化二砷;多发性骨髓瘤;凋亡

VK₃ Enhances Apoptosis of Multiple Myeloma RPM I 8226 Cells Induced by Arsenic Trioxide

Deng Shu, Shen Jianping, Shen Yiping, Lin Shengyun, Hu Zhiping, Zheng Zhiyin, Zhou Yuhong

(The first Affiliated hospital of Zhejiang Chinese medical university Hangzhou 310006. zhejiang. china)

Abstract Objective: To investigate the effect of VK₃ on arsenic trioxide induced apoptosis of multiple myeloma RPMI8226 cells and the molecular mechanisms. **Methods:** Growth inhibition of RPMI8226 cells exposed to Vitamin K₃ Combination with As₂O₃ was analyzed by MTT assay, Annexin V labeling. **Results:** As₂O₃ alone could inhibit the growth and induce apoptosis of RPMI 8226 cells, while As₂O₃ inhibited the proliferation of RPMI8226 cells in a time and dose - dependent manner. Compared with As₂O₃ treatment alone, growth inhibition was enhanced by combination therapy with As₂O₃ and VK₃ ($P < 0.05$), Annexin V staining showed the earlier apoptotic cells. Flow cytometry showed that the proportion of G₀/G₁ cells was increased and cell proportion in phase was decreased with appearance of apoptosis peak. **Conclusion:** VK₃ enhances the apoptosis induced by arsenic trioxide in RPMI8226 cells.

Key Words VK₃; As₂O₃; Multiple Myeloma; Apoptosis

多发性骨髓瘤(Multiple Myeloma, MM)是一种浆细胞恶性肿瘤。目前,对于晚期、复发和耐药 MM 患者的治疗仍然是一个难题。已有研究表明三氧化二砷(As₂O₃)在体外能够抑制骨髓瘤细胞的增殖并诱导凋亡^[1]。本实验通过研究 As₂O₃ 联合维生素 K₃ 对 RPMI8226 细胞增殖与凋亡的影响,期望为临床合理应用 As₂O₃, 治疗 MM 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 由本科室长期保存,实验从 -80℃ 冰箱取出,快速复苏后传代培养备用。培养基为 RPMI - 1640 培养液,于 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2 主要试剂及仪器 RPMI1640 培养液:Sigma 公司产品。小牛血清:杭州四季青生物工程材料研究所产品。四甲基噻唑氮蓝(MTT,华美生物工程公司),二甲亚砜(Sigma 公司);Annexin - V - FITC 凋亡检测试剂盒(深圳晶美公司)。As₂O₃ 注射液(黑龙江伊达药业公司),维生素 K₃(无锡第七制药厂),两药使用前均用

不含血清的 RPMI - 1640 稀释至所需浓度。FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 实验分组 根据所加药物不同分为 4 组,依次为空白对照组、维生素 K₃ 组、As₂O₃ 组、维生素 K₃ + As₂O₃ 组。细胞培养取对数生长期细胞,以 RPMI - 1640 培养液调整细胞浓度至 2×10^5 /mL。在 24 孔培养板中分别加入 2mL 细胞悬液。空白对照组加入培养液。维生素 K₃ 组加入维生素 K₃, 浓度分别为 2μmol/L, 5μmol/L, 10μmol/L。As₂O₃ 组加入 As₂O₃, 使其终浓度为 2μmol/L。维生素 K₃ + As₂O₃ 组同时加入维生素 K₃ 和 As₂O₃, 各孔细胞悬液中 As₂O₃ 的终浓度均为 5μmol/L, 维生素 K₃ 的终浓度分别为 2μmol/L, 5μmol/L, 10μmol/L(根据参考文献及多次预实验确定)。加药后 12h、24h、48h、72h 收集细胞。

1.3.2 MTT 实验 用含 10% 小牛血清的 RPMI - 1640 培养液将对数生长期的 RPMI8226 细胞配制成 5×10^5 个/mL 细胞悬液,每孔 200μL 加入 96 孔培养板

内。分别以不同的时间点和药物浓度作为一组,每组均设 3 个复孔及 1 个对照孔,对照孔加入空白对照孔的细胞。然后每孔加入 5mg/mL MTT 20 μ L,再培养 4h,离心,弃上清,每孔加 200 μ L 二甲亚砜,振荡至结晶溶解后用酶联仪测定吸光度 A 值(测试波长 600nm)。以该组复孔的平均值作为该组细胞的 A 值。细胞生长抑制率 = $1 - (A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

1.3.3 细胞周期检测 药物与 RPMI8226 细胞共同培养 48h,每组收集 1×10^6 个细胞,70% (体积分数)乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,加入 RNA 酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化 15 ~ 30min 以上,加入 PI,4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 20min,加入适量 PBS,上流式细胞仪检测。重复实验 3 次。

1.3.4 流式细胞术 AnnexinV/PI 标记法检测凋亡 As_2O_3 及维生素 K_3 单独及联合作用 RPMI8226 细胞同上,实验按照说明书操作,细胞周期检测药物与 RPMI8226 细胞共同培养 48h,离心收集细胞 10^6 ,PBS 洗两次,用 $1 \times \text{binding buffer}$ 490 μ L 重悬细胞,然后加入 FITC(异硫氰酸荧光素)标记的 Annexin V (FITC - Annexin V) 和 PI 各 5 μ L,置冰上作用 10min,然后上流式细胞仪检测分析。重复实验 3 次。

1.4 统计分析 采用 SPSS10.0 统计软件做单因素方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 As_2O_3 和 As_2O_3 联合维生素 K_3 对 RPMI8226 细胞的生长抑制作用 单用 2 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L 维生素 K_3 对 RPMI8226 细胞生长有一定的抑制作用,且其作用呈时间和剂量依赖性;单用 2 μ mol/L As_2O_3 对 RPMI8226 细胞生长有一定抑制作用,2 μ mol/L As_2O_3 联合维生素 K_3 对 RPMI8226 细胞生长抑制作用与维生素 K_3 剂量和作用时间有关,2 μ mol/L As_2O_3 联合 2、5、10 μ mol/L 维生素 K_3 作用 48h、72h 对 RPMI8226 细胞生长抑制显著 ($P < 0.05$)。

2.2 DNA 含量分析 2 μ mol/L As_2O_3 作用于 RPMI8226 细胞 48h 后,出现 G_0/G_1 期细胞增高,S 期减少;2 μ mol/L As_2O_3 联合 5 μ mol/L 维生素 K_3 作用于 RPMI8226 细胞 48h 后,出现 G_0/G_1 期细胞增高,S 期降低,且 2 μ mol/L As_2O_3 联合 5 μ mol/L 维生素 K_3 较单用 2 μ mol/L As_2O_3 后 G_0/G_1 期细胞增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 As_2O_3 和 As_2O_3 联合维生素 K_3 对 RPMI8226 细胞的凋亡率影响 2 μ mol/L As_2O_3 和 2 μ mol/L As_2O_3 联合 5 μ mol/L 维生素 K_3 作用于 RPMI8226 细胞 48h 后,细胞凋亡率较空白对照组显著增高 ($P < 0.05$),且 2 μ mol/L As_2O_3 联合 5 μ mol/L 维生素 K_3 较单用

2 μ mol/L As_2O_3 细胞凋亡率增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 示不同浓度的维生素 K_3 和 As_2O_3 单独及联合作用 48h RPMI8226 细胞的凋亡率

组别	细胞周期			凋亡率 (%)
	G_0/G_1	S	G_2/M	
对照组	38.27 $\pm$ 1.23	44.59 $\pm$ 0.32	16.33 $\pm$ 0.72	1.16
2 μ mol/L As_2O_3	37.58 $\pm$ 0.59	37.58 $\pm$ 0.82	22.07 $\pm$ 0.44	2.77
2 μ mol/L As_2O_3 + 5 μ mol/L VK_3	26.80 $\pm$ 0.70	29.05 $\pm$ 0.90	22.92 $\pm$ 0.96	21.3
2 μ mol/L As_2O_3 + 10 μ mol/L VK_3	20.21 $\pm$ 0.88	17.50 $\pm$ 1.55	11.33 $\pm$ 0.37	44.27

不同剂量的 As_2O_3 、维生素 K_3 单独及联合作用 48h 后细胞的凋亡率。分别为对照组,2 μ mol/L As_2O_3 , 2 μ mol/L As_2O_3 + 5 μ mol/L 维生素 K_3 组, 2 μ mol/L As_2O_3 + 10 μ mol/L 维生素 K_3 组。

3 讨论

As_2O_3 是中药砒霜的主要成分,随着医学的发展,砒的毒理、药理研究也有了进展, As_2O_3 在体外可以诱导多种肿瘤细胞凋亡^[2-3]。本实验表明: As_2O_3 与维生素 K_3 联合作用明显提高了 RPMI 8226 细胞对 As_2O_3 的敏感性、S 期细胞减少、使 MM 细胞阻滞于 G_1 期,并抑制细胞增殖、促进细胞凋亡。这与砒剂能使淋系肿瘤发生 G_1 期阻滞和使 NB4 细胞发生 G_2/M 期阻滞结果一致^[4]。近年来国外不少学者报道,维生素 K_3 对某些肿瘤细胞系的增殖具有抑制作用,并能诱导肿瘤细胞发生凋亡^[5]。近年来国外不少学者报道,维生素 K_3 对某些肿瘤细胞系的增殖具有抑制作用,并能诱导肿瘤细胞发生凋亡^[6]。用 As_2O_3 与维生素 K_3 联合治疗 MM,可以减少 As_2O_3 的用量,降低砒剂对机体的毒性,起到增效减毒的作用,为临床治疗复发、难治 MM 提供了新思路。

参考文献

- [1] Grad J M, Balis N J, Krett N, et al. Arsenic trioxide uses caspasedependent and caspase-independent pathways in myeloma cells [J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(11): 1155 - 1164.
- [2] YI Jing, YANG Jie, HE Rong, et al. Emodin enhances arsenicinduced-apoptosis via generation of reactive oxygen species and inhibition of survival signaling [J]. Cancer Res, 2004, 64: 108 - 116.
- [3] 周宇红, 黄晓瑞, 蔡循, 等. 三氧化二砷诱导骨髓瘤细胞凋亡机制研究 [J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(3): 181 - 183.
- [4] Rousselot P, Labaume S, Marolleau J P, et al. Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patient s. Cancer Res, 1999, 59: 1041 - 1048.
- [5] 徐波, 王洁, 卜度宏. 三氧化二砷体外诱导宫颈癌细胞株凋亡及其机制的研究 [J]. 实用医学杂志, 2006, 22(3): 245 - 247.
- [6] Rajkumar S V, Leong T, Roche PC, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(8): 3111 - 3116.

(2012-06-01 收稿)