

三氧化二砷对非霍奇金淋巴瘤细胞的增殖抑制及凋亡作用*

汕头大学医学院第一附属医院 邢学仰 吴禹宏¹ 张昕 陶红芳 林绍泽 侯展文 苏永忠*,
汕头 515041

摘要 目的:探讨三氧化二砷(ATO)对非霍奇金淋巴瘤(NHL)细胞株 Raji 和 Jurkat 增殖和凋亡的影响及其相关机制。方法:运用 CCK-8 法、Annexin V FITC/PI 双染流式检测法、蛋白免疫印迹法分别检测 ATO 对 Raji 和 Jurkat 的增殖、凋亡以及凋亡相关蛋白 caspase-3、PARP、caspase-8 和 caspase-9 表达的变化。结果:ATO 能明显抑制 Raji 细胞和 Jurkat 细胞生长增殖,且呈时间依赖性和浓度依赖性;ATO 可诱导 Raji 细胞和 Jurkat 细胞凋亡,且呈现一定的时间依赖性;ATO 可引起 Raji 细胞 cleaved-caspase-3、cleaved-PARP、cleaved-caspase-9 表达增加(均 $P < 0.05$),而对 caspase-8 的影响无明显差别;ATO 可引起 Jurkat 细胞 cleaved-caspase-3、cleaved-PARP、cleaved-caspase-8、cleaved-caspase-9 表达增加(均 $P < 0.05$)。结论:ATO 明显抑制 Raji 细胞和 Jurkat 细胞的增殖,并诱导细胞凋亡,Raji 细胞凋亡效果较弱,主要由线粒体途径介导,而 Jurkat 细胞凋亡明显,由线粒体途径和死亡受体途径共同介导。

关键词 三氧化二砷;非霍奇金淋巴瘤;急性淋巴细胞白血病;增殖;凋亡

中图分类号 R557⁺.4 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz202002013

Arsenic trioxide induces proliferation inhibition and apoptosis in non-Hodgkin lymphoma cell lines XING Xue-yang, WU Yu-hong¹, ZHANG Xin, TAO Hong-fang, LIN Shao-ze, HOU Zhan-wen, SU Yong-zhong*. The First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Abstract Objective: To investigate the effect and mechanism of arsenic trioxide on the proliferation and apoptosis of non-Hodgkin lymphoma cell lines Raji and Jurkat. Methods: Cell Counting Kit-8 (CCK8) assay, Annexin V FITC/PI flow cytometry, Western blotting were respectively used to detect the effect of arsenic trioxide on the proliferation, apoptosis of Raji and Jurkat and the expression of apoptosis-related proteins, caspase-3, PARP, caspase-8 and caspase-9. Results: Arsenic trioxide significantly inhibited the proliferation of Raji and Jurkat cells in concentration-dependent and time-dependent manners. Arsenic trioxide induced apoptosis in Raji and Jurkat cells, even more the proportion of apoptosis increased time-dependently to some extent. Arsenic trioxide increased the expression of cleaved-caspase-3, cleaved-PARP, cleaved-caspase-9 in Raji cells (all $P < 0.05$), but had no significant effect on cleaved-caspase-8. Arsenic trioxide increased the expression of cleaved-caspase-3, cleaved-PARP, cleaved-caspase-8, cleaved-caspase-9 in Jurkat cells (all $P < 0.05$). Conclusion: Arsenic trioxide significantly inhibited the proliferation of Raji cells and Jurkat cells, which was related to the induction of apoptosis, while the apoptosis of Raji cells was mild, mainly mediated by mitochondrial pathway, and the apoptosis of Jurkat cells was obvious, mediated by mitochondrial pathway and death receptor pathway.

Key words Arsenic trioxide; Non-Hodgkin lymphoma; Acute lymphoblastic leukemia; Proliferation; Apoptosis

三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)是目前临床治疗急性早幼粒白血病最有效的药物^[1,2],被广泛应用于多发性骨髓瘤等其他血液系统肿瘤以及肝癌等实体肿瘤的治疗和研究^[3]。非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)是一组具有很强异质性的淋巴瘤,易发生早期扩散,目前部分类型 NHL

治疗效果仍不理想。ATO 单药或联合化疗治疗复发或难治性 NHL 安全有效,但其机制尚不明确^[4~6]。本研究以 NHL 细胞株 Raji 和 Jurkat 为研究对象,用 ATO 按不同浓度、不同时间进行处理,探究 ATO 对细胞增殖和凋亡的影响及其相关机制。

材料与方法

实验试剂 胎牛血清、RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司;CCK8 购自碧云天公司;Annexin V-FITC/PI Kit/凋亡检测试剂盒购自北京四正柏生物

*基金项目:广东省医学科研基金项目(No:A2016503);
汕头市科技计划项目[汕府科(2015)132号-119]

¹ 汕头大学医学院

*通信作者:苏永忠, E-mail: suyzst@126.com

科技有限公司;Caspase-3、caspase-8、caspase-9、PARP 辣根过氧化物酶标记的抗兔及抗鼠二抗购自 Cell Signaling Technology 公司; β -Actin 抗体购自 Bioworld 公司;GAPDH 抗体购自杭州贤至生物科技有限公司。

药物和细胞株 ATO 购自北京双鹭药业股份有限公司,用磷酸缓冲液(PBS)溶解;细胞株 Jurkat 由汕头大学医学院中心实验室馈赠,细胞株 Raji 购自南京贝瑞吉生物科技有限公司。

主要仪器 自动酶标仪 Multiskan Ascent 购自上海热电仪器有限公司;小型流式细胞仪 BDTM Accuri C6 购自美国 BD 公司;电泳仪购自美国 Bio-Rad 有限公司;电泳槽购自北京六一生物科技有限公司。

细胞培养 将对数生长期细胞以密度约 $3.5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,置于 37°C , 5% CO_2 细胞培养箱中培养,每隔 2~3 d 传代。

CCK-8 法检测细胞生长增殖 将对数生长期的细胞(Raji 细胞密度约为 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$, Jurkat 细胞密度约为 $2.4 \times 10^5/\text{mL}$)接种于 6 孔板,每孔 2.5 mL,设对照组及不同浓度 ATO 组(Raji 为 1、2、4、8、12 $\mu\text{mol/L}$; Jurkat 为 8、16、24、32、40 $\mu\text{mol/L}$),置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养,培养 12、24、36、48、60 h 后吹打混匀细胞,收集 300 μL 细胞悬液置于冰上,余下细胞继续培养。将收集的细胞悬液 4°C , 1000 转/min,离心 5 min,弃去上清,经预冷 PBS 洗 2 遍(4°C , 1000 转/min, 5 min)后弃去上清,用 300 μL 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液重悬,接种于 96 孔板,每组设 3 个复孔,每孔 100 μL 细胞悬液,并增加空白组,3 个复孔,每孔 100 μL 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,在避光条件下加入 10 μL LCCCK8 试剂摇匀,置于 37°C , 5% CO_2 , 饱和湿度培养箱孵育 1~4 h 后用酶标仪检测波长 450 nm 吸光度值(OD 值),计算抑制率 $[1 - (\text{OD}_{\text{ATO组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}})]$ 。

流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 将对数生长期细胞(Raji 细胞密度约为 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$, Jurkat 细胞密度约为 $2.4 \times 10^5/\text{mL}$)接种于 12 孔板,每孔 2 mL,设置对照组和 ATO 组(根据 CCK-8 结果取 Raji 为 4 $\mu\text{mol/L}$, Jurkat 为 24 $\mu\text{mol/L}$),置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养,分别培养一定时间(Raji 为 24、36、48 h; Jurkat 为 12、24、36 h)后吹打混匀细胞,收集 400 μL 细胞悬液置于冰上。将收集的细胞悬液 4°C , 1000 转/min,离心 5 min,

弃去上清,经预冷 PBS 洗 2 遍(4°C , 1000 转/min, 5 min)后弃去上清,用 100 μL 结合缓冲液重悬,避光条件下加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀孵育 5 min,再加入 10 μL PI 混匀,最后加入 400 μL 预冷 PBS 混匀,1 h 内流式细胞仪上机检测,每管收集至少 10 000 个细胞。

蛋白免疫印迹法检测细胞凋亡相关蛋白表达的变化 将对数生长期细胞(Raji 细胞密度约为 $4.0 \times 10^5/\text{mL}$, Jurkat 细胞密度约为 $4.5 \times 10^5/\text{mL}$)接种于 60 mm 培养皿,设置对照组和 ATO 组(Raji 为 4 $\mu\text{mol/L}$, Jurkat 为 24 $\mu\text{mol/L}$),分别培养一定时间(根据流式细胞术结果取 Raji 为 36 h; Jurkat 为 24 h)后收集全部细胞悬液置于冰上。将收集的细胞悬液 4°C , 1000 转/min,离心 5 min,弃去上清,经预冷 PBS 洗 2 遍(4°C , 1000 转/min, 5 min)后弃去上清,加入含 PMSF 及蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液(RIPA: PMSF: 蛋白酶抑制剂为 100: 1: 1)120 μL 置于冰上裂解 30 min,每隔 5 min 震荡 1 次,然后超声 3 次,间隔 15 s 一次,每次 3 s,最后将蛋白 4°C , 12 000 转/min,离心 15 min,留取上清液即为总蛋白,留取一部分用 BCA 法测定蛋白浓度,其余按体积 4:1 加入 5 $\times$ 上样缓冲液后煮沸 10 min。用 10%~12% SDS-PAGE 凝胶 60 mV 恒压电泳分离蛋白,然后 200 mA 恒电流转将蛋白湿转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后 4°C 孵育相应一抗过夜,经 1 $\times$ TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,然后用连接有辣根过氧化物酶的对应该种属的二抗室温孵育 1 h,用 1 $\times$ TBST 洗涤 3 次,每次 10 min 后化学发光仪发光。

统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 及 SPSS 20.0 统计软件包。所有实验重复 3 次以上,细胞增殖与毒性检测、流式细胞术结果采用单因素方差分析,两两比较选择 Dunnett 检验(与对照组比较);蛋白免疫印迹结果采用两独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

ATO 对 Raji 和 Jurkat 细胞生长增殖的抑制作用 ATO 显著抑制 Raji 和 Jurkat 细胞增殖。除了 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATO 作用于 Raji 细胞 12、24 h 及 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATO 作用于 Raji 细胞 12 h 没有明显的抑制作用,其他浓度和时间点均显示明显增殖抑制作用。在同一浓度作用下,ATO 对 Raji 和 Jurkat 细胞的增殖抑制作用随时间延长不断增强;在同一作用时间下,ATO 对 Raji 和 Jurkat 细胞的增殖抑制作用随浓度增大不断增

强,这表明 ATO 对 Raji 和 Jurkat 细胞的增殖抑制作用呈浓度依赖性和时间依赖性,见图 1。

ATO 作用于 Raji 细胞 12、24、36、48、60 h 的半抑制浓度(IC_{50})分别为 7.41、5.52、2.85、2.04、1.69 $\mu\text{mol/L}$;而作用于 Jurkat 细胞分别为 22.46、19.03、13.59、10.13、4.72 $\mu\text{mol/L}$,见图 2。

ATO 对 Raji 和 Jurkat 细胞的凋亡诱导作用 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞散点图显示,对照组的 Raji 和 Jurkat 细胞绝大部分阴性对照细胞分

布于左下象限,少部分细胞分布于其他象限,表明对照组细胞生长状态良好。在 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATO 作用下,随着作用时间延长,Raji 细胞逐渐向右、向上分布,Raji 细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率均逐渐增加,呈现明显的时间依赖性;在 24 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATO 作用下,随着作用时间延长,右上象限、右下象限 Jurkat 细胞明显增多,形成明显细胞群,Jurkat 细胞的早期凋亡率先增加后减少,晚期凋亡率逐渐增加,而总凋亡率先增加后略下降,见图 3。

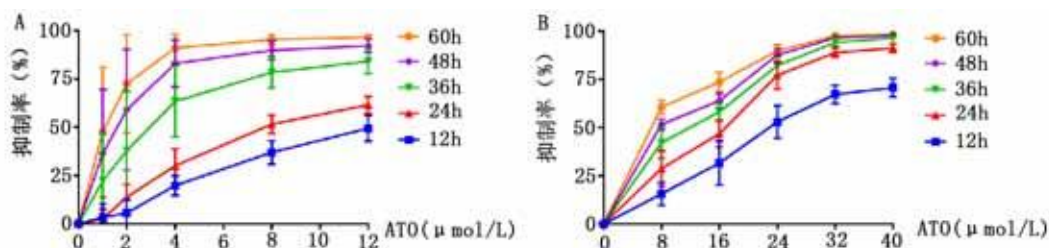


图1 ATO对(A)Raji细胞和(B)Jurkat细胞增殖的影响

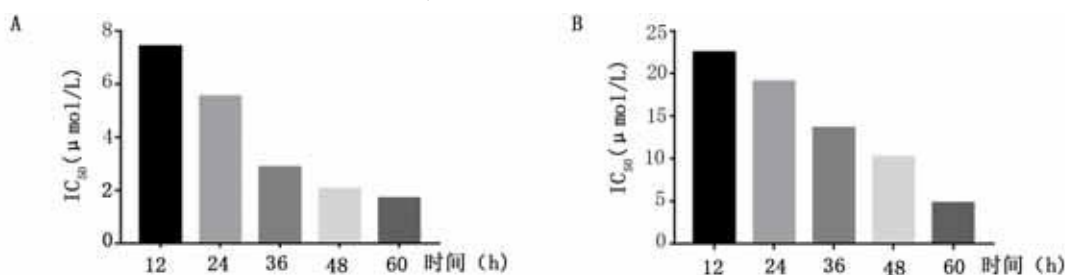


图2 ATO作用于(A)Raji细胞和(B)Jurkat细胞的 IC_{50}

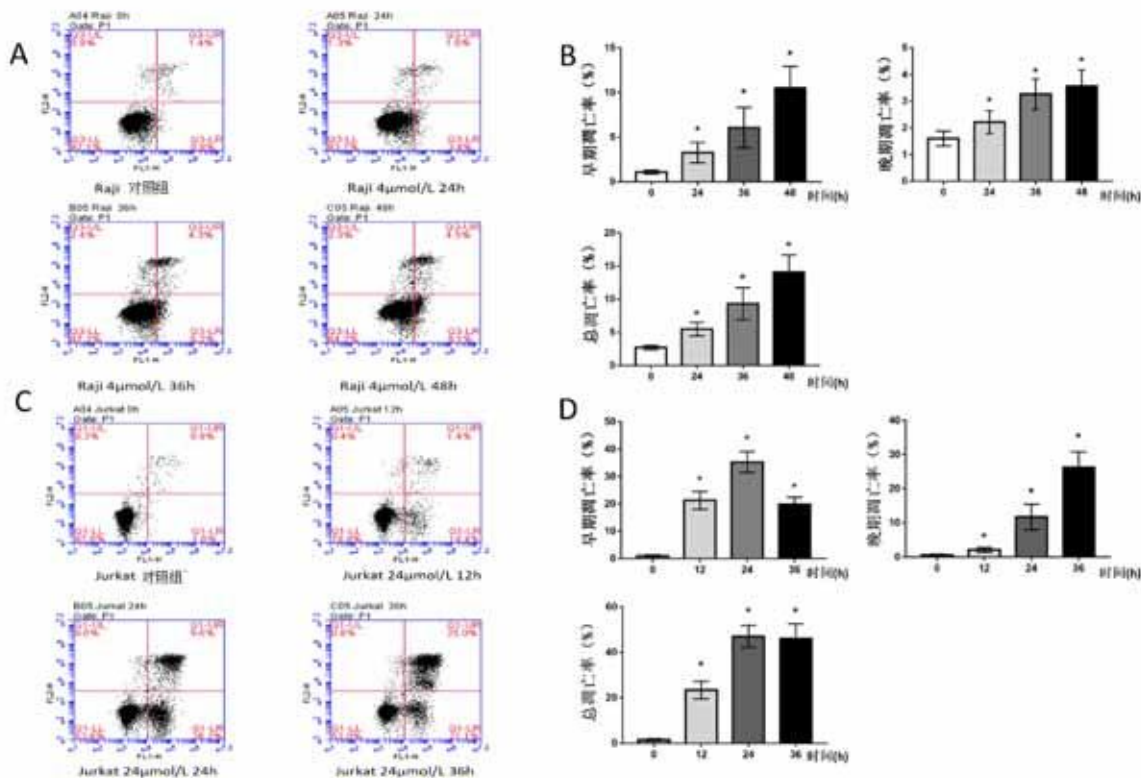


图3 ATO作用于(A)Raji细胞和(C)Jurkat细胞的流式细胞散点图;ATO诱导(B)Raji细胞和(D)Jurkat细胞的凋亡率(与对照组比较,* $P < 0.05$)

ATO 对 Raji 和 Jurkat 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATO 作用于 Raji 细胞 48 h, 与对照组相比, 尽管 pro-caspase-3 和 pro-PARP 的差异无统计学意义, 但 cleaved-caspase-3、cleaved-PARP、pro-caspase-9 及 cleaved-caspase-9 的表达上调, 且差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (此外 pro-caspase-8 及 cleaved-caspase-8 差异均无统计学意义, 结果未展示), 这表明 ATO 可通过线粒体途径诱导 Raji 细胞凋亡, 见图 4。

24 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATO 作用于 Jurkat 细胞 36 h, 与对照组相比, pro-caspase-3、pro-PARP、pro-caspase-8 和 pro-caspase-9 表达下调, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 且 cleaved-caspase-3、cleaved-PARP、cleaved-caspase-8 和 cleaved-caspase-9 表达均上调, 差异有统计学意义, 这表明 ATO 可通过线粒体途径及死亡受体途径诱导 Jurkat 细胞凋亡, 见图 5。

讨论

近半个世纪以来, 关于 ATO 研究不断深入开

展, 其抗肿瘤机制逐渐清晰, 包括抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞分化、影响肿瘤血管形成等^[7]。本研究主要从细胞增殖及细胞凋亡两方面研究 ATO 对 NHL 的抗肿瘤作用, 结果显示 ATO 对 Raji 和 Jurkat 细胞有增殖抑制作用, 且呈浓度依赖性和时间依赖性, 而低浓度的 ATO 短时间作用于 Raji 细胞改变无统计学意义, 与相关研究结果基本一致^[8], 表明 ATO 可通过抑制 NHL 细胞增殖发挥抗肿瘤作用。此外, 沈志祥等^[9]报道 10 mg ATO 静脉滴注输注完毕约 4 h 后血浆药物浓度快速达到高峰 (5.54 ~ 7.30) $\mu\text{mol/L}$, 分布半衰期为 (0.89 $\pm$ 0.29) h, 清除半衰期为 (12.13 $\pm$ 3.31) h, 这表明静脉滴注 ATO 可在短时间内起效, 并能保证长时间足量的血药浓度。因此, ATO 浓度依赖性和时间依赖性的特性及血浆中起效快、作用持久的特点表明其非常适合用于抗血液肿瘤治疗。

细胞凋亡主要包括内源性途径/线粒体途径和外源性途径/死亡受体途径, caspase-9 是内源性凋亡途径的 executor, caspase-8 是外源性凋亡途径的执

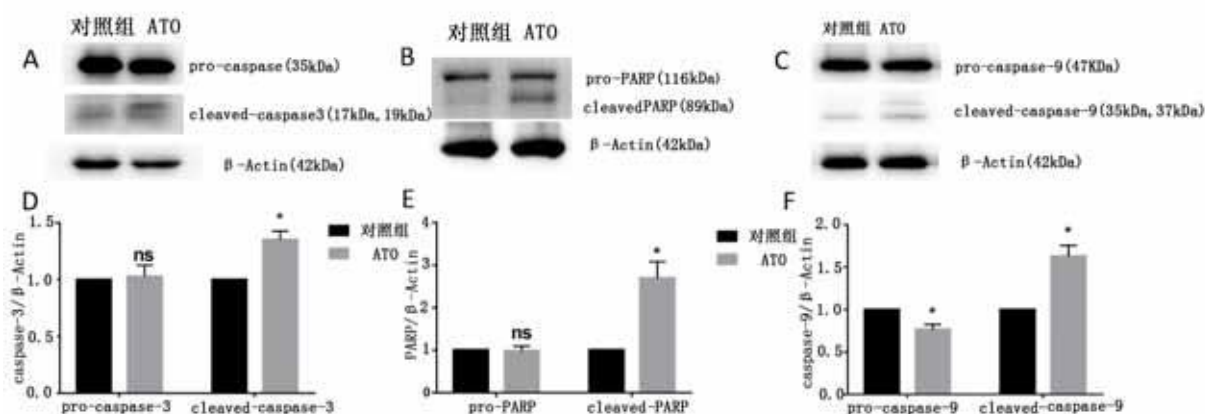


图4 ATO 对 Raji 细胞(A和D)pro-caspase-3 和 cleaved-caspase-3, (B和E)pro-PARP 和 cleaved-PARP 以及(C和F)pro-caspase-9 和 cleaved-caspase-9 表达的影响(与对照组比较, * $P < 0.05$)

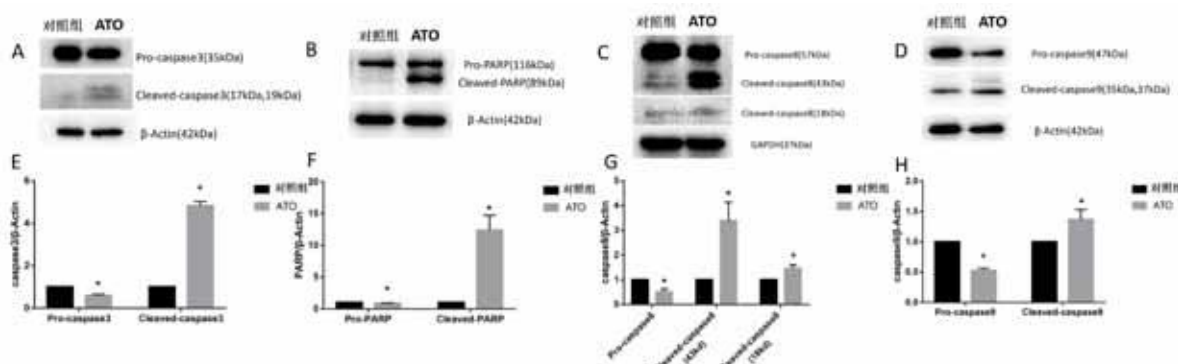


图5 ATO 对 Jurkat 细胞(A和E)pro-caspase-3 和 cleaved-caspase-3, (B和F)pro-PARP 和 cleaved-PARP, (C和G)pro-caspase-8 和 cleaved-caspase-8 以及(D和H)pro-caspase-9 和 cleaved-caspase-9 表达的影响(与对照组比较, * $P < 0.05$)

行者, caspase-3 是最终凋亡执行分子, 而 PARP 是 caspase-3 下游剪切对象, 可作为凋亡的标志。本研究结果显示 ATO 作用后 Raji 和 Jurkat 细胞的 cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP 均明显升高, 表明 ATO 可诱导 NHL 细胞凋亡, 发挥抗肿瘤作用。ATO 对 Raji 作用仅引起 cleaved-caspase-9 表达增加, 而对 cleaved-caspase-8 无明显改变, 表明其促凋亡作用通过线粒体途径介导, 这与相关报道 ATO 通过线粒体途径诱导急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞、套细胞淋巴瘤 jeko-1 细胞发生凋亡相一致^[10, 11], 而 ATO 对 Jurkat 细胞作用, 使 cleaved-caspase-8 和 cleaved-caspase-9 表达均增加, 表明其促凋亡作用通过线粒体途径和死亡受体途径共同介导, 与流式细胞术显示 Jurkat 凋亡比例明显增加相吻合, 提示 ATO 由线粒体途径介导的促凋亡作用较普遍但效果较弱, 而由线粒体途径和死亡受体途径共同介导的促凋亡作用仅见于部分细胞但效果明显。

虽然 ATO 可显著抑制 Raji 和 Jurkat 细胞增殖并诱导细胞凋亡, 但 Jurkat 细胞各时间点所需 ATO IC₅₀ 均明显高于 Raji 细胞。周晋等^[12]发现细胞内砷浓度不同可能是 ATO 治疗敏感性不同的原因之一, 而细胞内药物浓度主要取决于细胞本身的特性; Benbija 等^[13]发现白血病 T 细胞系对 ATO 细胞毒性的敏感性取决于诱导细胞表面磷酸酶 B220/CD45R 的表达, 这提示 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤对 ATO 的敏感性可能不一样, 有待进一步研究。Jurkat 细胞的增殖抑制和凋亡需要高浓度的 ATO, 这意味着更大的副作用, 不利于进一步临床研究, 但高浓度的 ATO 的确发挥了显著的抗肿瘤效应。周晋等^[12]发现最低促凋亡浓度水平以上的低浓度长时间持续干预比短期高浓度干预的细胞内砷浓度高, 凋亡率大。Duan 等^[14]研究表明 ATO 联合紫杉醇协同阻滞恶性淋巴细胞有丝分裂优于单用 ATO; 此外也有报道其他类型的砷剂如口服砷剂偏磷酸钠、Darinaarsin 等用于治疗 NHL 可有良好效果甚至更优的效果^[15, 16]。因此, 延长低浓度的 ATO 作用时间、ATO 联合其他药物或者应用其他类型的砷剂可能在降低砷剂用量的同时保证其安全性而又取得相同甚至更好的抗肿瘤效果, 值得我们进一步研究。

参考文献

1 Kayser S, Krzykalla J, Elliott MA, et al. Characteristics and outcome of

patients with therapy-related acute promyelocytic leukemia front-line treated with or without arsenic trioxide[J]. *Leukemia*, 2017, 31(11): 2347-2354.

2 Platzbecker U, Avvisati G, Cicconi L, et al. Improved outcomes with retinoic acid and arsenic trioxide compared with retinoic acid and chemotherapy in Non-High-Risk acute promyelocytic leukemia: final results of the randomized Italian-German APL0406 Trial[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(6): 605-612.

3 姚红方, 张程, 张小润. 三氧化二砷在肿瘤治疗中的应用[J]. *中国医疗前沿*, 2013, 8(7): 19-21.

4 黄勇, 秦叔逵, 王琳, 等. 三氧化二砷注射液治疗复发难治性恶性淋巴瘤的临床研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2007(8): 598-600.

5 徐昕, 戴秋新, 徐茂忠. 亚砷酸治疗难治性恶性淋巴瘤 12 例临床疗效分析[J]. *实用临床医药杂志*, 2011, 15(15): 86-88.

6 Zhao H, Sun G, Kong D, et al. A phase II study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory malignant lymphoma[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(3): 79.

7 王长安, 邓述恺. 三氧化二砷抗肿瘤机制研究进展[J]. *肿瘤基础与临床*, 2011, 24(05): 458-460.

8 Zhong L, Xu F, Chen F. Arsenic trioxide induces the apoptosis and decreases NF- κ B expression in lymphoma cell lines[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6267-6274.

9 Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, et al. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients[J]. *Blood*, 1997, 89(9): 3354-3360.

10 Waxman S, Xia L, Wang R, et al. Downregulation of Mcl-1 through GSK-3 β activation contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells[J]. *Leukemia*, 2013, 27(2): 315-324.

11 费爱梅, 毛朝明, 刘静静, 等. 三氧化二砷诱导套细胞淋巴瘤细胞株凋亡及机制研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(4): 909-913.

12 周晋, 孟然, 关秀茹, 等. 细胞内砷浓度与三氧化二砷治疗敏感性的关系[J]. *中国药理学杂志*, 2004(3): 33-35.

13 Benbija M, Mellouk A, Bobé P. Sensitivity of leukemic T-cell lines to arsenic trioxide cytotoxicity is dependent on the induction of phosphatase B220/CD45R expression at the cell surface[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(1): 251.

14 Duan X, Wu Y, Xu H, et al. Synergistic mitosis-arresting effects of arsenic trioxide and paclitaxel on human malignant lymphocytes[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 183(1): 222-230.

15 Yoon JS, Hwang DW, Kim ES, et al. Anti-tumoral effect of arsenic compound, sodium metaarsenite (KML001), in non-Hodgkin's lymphoma: an in vitro and in vivo study[J]. *Invest New Drugs*, 2016, 34(1): 1-14.

16 Ravi D, Bhalla S, Gartenhaus RB, et al. The novel organic arsenical darinaarsin induces MAPK-mediated and SHP1-dependent cell death in T-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma cells and human xenograft models[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(23): 6023-6033.

(2019-10-03 收稿 2020-01-12 修回)