

康莱特注射液对 HL-60/ADR 细胞周期调控蛋白 P16、P63 表达的影响

余永莉, 李季蓉(遵义医学院珠海校区解剖组胚胎教研室, 广东 珠海 519041)

摘要: 目的 探索康莱特注射液对 HL-60/ADR 细胞周期调控蛋白 P16、P63 表达的影响。方法 使用康莱特注射液作用于 HL-60/ADR 细胞, 用细胞计数法检测康莱特注射液对 HL-60 细胞生长曲线的影响, MTT 法检测阿霉素对康莱特注射液作用后细胞的抑制效应。康莱特注射液作用 HL-60/ADR 细胞一定时间后, 再用一定浓度的阿霉素作用该细胞一定时间, 流式细胞仪检测该细胞内的阿霉素浓度并分析细胞周期调控蛋白 P16、P63 的表达。结果 各组细胞计数第 6 天达峰值, 康莱特注射液各组细胞计数, 较未加药组细胞计数低($P<0.05$)。1 mg·mL⁻¹ 康莱特注射液作用 HL-60/ADR 细胞 96 h, 阿霉素对该细胞的抑制效应较对康莱特注射液未作用的 HL-60/ADR 细胞抑制效应强($P<0.05$); 不同浓度的康莱特注射液作用 HL-60/ADR 细胞 96 h 后, 再用 1.5 μg·mL⁻¹ 的阿霉素作用 6 h, 该细胞内的阿霉素荧光强度平均值(127.2±4.8)较对照组(77.8±7.2)高($P<0.05$), 且具有剂量依赖关系; 1 mg·mL⁻¹ 康莱特注射液作用 HL-60/ADR 细胞 48 h, HL-60/ADR 细胞的细胞周期调控 P16 的平均值(898.46±30.50)较对照组(698.45±91.29)高($P<0.05$); P63 的平均值(837.53±42.75)较对照组(591.33±92.99)高($P<0.05$)。结论 康莱特注射液对 HL-60 细胞生长有抑制作用, 可能有促进细胞对阿霉素的敏感性的作用。康莱特注射液还有上调 HL-60/ADR 细胞周期调控蛋白 P16、P63 的表达, 此机制可能参与康莱特注射液抗肿瘤作用。

关键词: 康莱特注射液; HL-60/ADR 细胞; 细胞周期; P16; P63

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)03-0202-04

The Effect of Kanglaite Injection on Expression of Cyclin Modulin P16, P63 in HL-60/ADR Cells

YU Yongli, LI Jirong(Department of Anatomy and Histology and Embryology, Zhuhai Campus of Zunyi Medical College, Zhuhai 519041, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of Chinese medicine Kanglaite injection on expression of cyclin modulin P16, P63 in HL-60/ADR cells. **METHODS** HL-60/ADR cells during logarithmic growth phase were treated with Kanglaite injection, growth curve was based on cell counting; the inhibitory effect of adriamycin(ADR) on Kanglaite injection-treated HL-60/ADR cells was tested by MTT assay; the concentration of intracellular adriamycin and the expression of P16, P63 were detected by flow cytometry. **RESULTS** In each group, live cell count reached a peak on the 6th day, compared with control group, the Kanglaite injection-treated cell count was lower with statistical significance($P<0.05$). Treated HL-60/ADR cells with 1 mg·mL⁻¹ Kamglaite for 96 h, the inhibitory effect of adriamycin on the cells were greater than that of control groups($P<0.05$). After treatment with different concentration of Kanglaite injection, the intracellular ADR fluorescence of 1.5 μg·mL⁻¹ ADR-treated for 6 h were statistical higher than that of control group($P<0.05$). Treated HL-60/ADR cells with 1 mg·mL⁻¹ Kamglaite for 48 h, compared with the control group, the expression of P16, P63 were all significantly increased($P<0.05$). **CONCLUSION** HL-60/ADR cells exposed to Kanglaite injection resulted in dose-depoment inhibitory, Kanglaite injection could increase the sensitivity of HL-60/ADR cells to ADR. Kanglaite injection could increase the expression level of P16, P63 in HL-60/ADR cells, that maybe involved in the anti-tumor mechanics of Kanglaite injection.

KEY WORDS: Kanglaite injection; HL-60/ADR cells; cell cycle; P16; P63

康莱特注射液是薏苡仁提取物研制而成的一种中成药, 临床和实验研究均证明其有明显的抗

肿瘤作用, 对多种抗癌药具有明显的增敏作用^[1]。笔者用康莱特注射液作用白血病细胞株 HL-60 细

基金项目: 贵州省卫生厅课题资助(2002-D181)

作者简介: 余永莉, 女, 硕士, 副教授 Tel: (0756)7623354 E-mail: yuyongli5088@sina.com

胞,发现其可诱导HL-60细胞形态向成熟粒细胞分化^[2],增加HL-60细胞内的阿霉素浓度^[3],下调P-170蛋白表达^[4],上调CyclinA蛋白的表达^[5]。为了进一步探索康莱特注射液抗肿瘤作用的机制,本试验选用影响细胞分化和凋亡的细胞周期调控蛋白P63, P16为观测指标,观察康莱特注射液对HL-60/ADR细胞周期调控蛋白P63, P16表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞:人早幼粒白血病细胞株HL-60/ADR(中国医学科学院血研所)。药物:康莱特注射液(10%)(浙江康莱特药业有限公司,4℃储存,批号:0309081)。阿霉素(深圳万乐有限公司,0305E1)。鼠抗人P63、P16羊抗鼠荧光抗体(上海华美生物技术公司)。

1.2 细胞培养

取一株白血病细胞株HL-60/ADR细胞接种于含20%小牛血清的RPMI 1640培养液,置于37℃,5%CO₂培养箱复苏后,接种于含10%小牛血清的RPMI 1640培养液中培养,待稳定后先加入0.1 μg·mL⁻¹阿霉素,逐渐加至0.5 μg·mL⁻¹,并使HL-60/ADR在含0.5 μg·mL⁻¹阿霉素培养液中培养,实验前1周无药培养。

1.3 康莱特注射液对HL-60/ADR细胞生长曲线的影响

取对数生长期HL-60/ADR细胞2×10⁵个·mL⁻¹,加入康莱特注射液,使终浓度分别为0.1, 1, 10 mg·mL⁻¹,并设立未加药对照组。进行活细胞计数,每组计数3次,取均值为当天的活细胞计数,连续计数7 d。

1.4 康莱特注射液对阿霉素抑制HL-60/ADR细胞效应影响的检测

取对数生长期HL-60/ADR细胞接种于新的培养瓶中,调节细胞终浓度为2×10⁵个·mL⁻¹,然后加入康莱特注射液,使终浓度为1 mg·mL⁻¹,并设立未加药对照组,置于37℃,5%CO₂培养箱分别培养96 h,收集上述2组细胞,无血清培养液离心洗2次,分别接种于3块96孔培养板,细胞终浓度为2×10⁵个·mL⁻¹,然后分别加入阿霉素,使终浓度分别为0.5, 1, 5, 10 μg·mL⁻¹,并设立未加药对照组,每种浓度均设4个复孔,调零孔为空白

孔。置于37℃,5%CO₂分别培养24, 48, 72 h,实验终止前4 h加入50 μg MTT。10%SDS-0.1 mol·L⁻¹ HCl终止反应,24 h后用酶标仪检测A₅₇₀值,以未加药细胞孔A₅₇₀值为对照组。细胞抑制率%=(1-给药组A值/对照组A值)×100%。

1.5 流式细胞仪检测HL-60/ADR细胞内阿霉素浓度^[5]

取对数生长期HL-60/ADR细胞接种于新的培养瓶中,调节细胞终浓度为2×10⁵个·mL⁻¹,然后加入康莱特注射液,使终浓度分别为0, 0.1, 1, 10 mg·mL⁻¹,置于37℃,5%CO₂培养箱分别培养96 h,收集各浓度组细胞,无血清培养液离心洗2次,调节各组细胞为2×10⁵个·mL⁻¹,分别加入阿霉素1.5 μg·mL⁻¹作用6 h,收集各组细胞,PBS离心洗2次,流式细胞仪检查细胞内荧光强度。

1.6 流式细胞仪检测HL-60/ADR细胞P63

分别收集0, 0.1, 1 mg·mL⁻¹康莱特注射液作用于48 h HL-60/ADR细胞1×10⁶个·mL⁻¹,用0.01 mol·L⁻¹ pH 7.2 PBS离心洗涤2次,每次5 min。加2%多聚甲醛200 μL固定15 min,加1 mL PBS,1 500 r·min⁻¹离心5 min。加0.5% Tritonx-100 100 μL打孔5 min弃上清。加一抗鼠抗人P63(1:200)100 μL 37℃水浴1 h,加1 mL PBS,1 500 r·min⁻¹离心5 min,弃上清。加二抗羊抗鼠荧光抗体(1:100)100 μL室温避光30 min,加1 mL PBS,1 500 r·min⁻¹离心5 min,弃上清。PBS重洗涤2次。加0.5 mL PBS置流式细胞仪检测。

1.7 流式细胞仪检测HL-60/ADR细胞P16

按“1.6”项下方法处理,但加一抗为鼠抗人P16(1:200)100 μL。

1.8 统计学处理

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行t检验处理。

2 结果

2.1 康莱特注射液对HL-60/ADR细胞生长曲线影响

各组细胞计数于第6天达峰值,康莱特注射液作用各组的HL-60/ADR细胞计数峰值较对照组细胞低($P < 0.05$)。说明康莱特注射液对HL-60/ADR细胞生长有抑制作用,该作用具有剂量依赖关系,结果见图1。

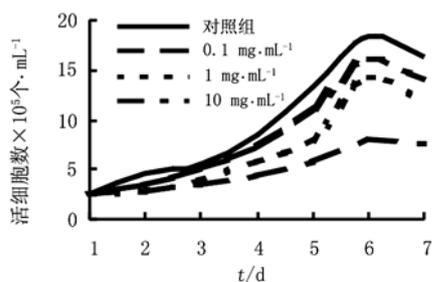


图1 康莱特注射液对 HL-60/ADR 细胞生长的影响

Fig 1 The effects of KLT on growth of HL-60/ADR cells

2.2 康莱特注射液对阿霉素抑制 HL-60/ADR 细胞效应的影响

把相同浓度的阿霉素对该 2 组细胞作用相同时间的抑制率进行比较,结果显示 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 康莱特注射液处理过的 HL-60/ADR 细胞对阿霉素的敏感性较未经过康莱特注射液处理的细胞的高,统计学分析有显著性差异($P<0.05$),结果见表 1。

表 1 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 康莱特注射液作用 HL-60/ADR 细胞 96 h 后,阿霉素对其的抑制效应($n=4, \bar{x}\pm s$)

Tab 1 The antiproliferation effects of ADR on HL-60/ADR cells which were treated for 96 h with $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kanglaite injection and $0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kanglaite injection($n=4, \bar{x}\pm s$)

组别	阿霉素/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IC/%		
		24 h	48 h	72 h
试验组	0.5	$24.5\pm 1.3^{1)}$	$27.4\pm 2.7^{1)}$	$44.9\pm 2.4^{1)}$
对照组		1.2 ± 0.5	2.6 ± 1.0	10.2 ± 1.4
试验组	1	$32.5\pm 10.3^{1)}$	$53.4\pm 6.8^{1)}$	$64.8\pm 1.5^{1)}$
对照组		11.5 ± 2.3	32.1 ± 4.4	44.2 ± 3.3
试验组	5	$36.3\pm 7.4^{1)}$	$56.2\pm 5.5^{1)}$	$67.1\pm 7.7^{1)}$
对照组		24.1 ± 5.5	44.9 ± 4.3	47.6 ± 5.1
试验组	10	$46.5\pm 11.2^{1)}$	$64.6\pm 15.3^{1)}$	$76.7\pm 4.8^{1)}$
对照组		31.7 ± 4.3	49.5 ± 7.2	68.9 ± 3.7

注:与对照组相比,¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$

2.3 康莱特注射液对 HL-60/ADR 细胞内阿霉素浓度的影响

浓度为 0.1, 1, $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 康莱特注射液作用 96 h 后的细胞,再用 $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的阿霉素作用 6 h,流式细胞仪检测细胞内的荧光强度分别为 106.3 ± 10.7 , 127.20 ± 4.8 , 164.8 ± 6.4 。对照组为 77.8 ± 7.2 ,康莱特注射液作用过的 HL-60/ADR 细胞内阿霉素浓度较对照组明显增高,统计学分析有显著性差异($P<0.05$)。且具有剂量依赖关系。

2.4 康莱特注射液对 HL-60/ADR 细胞 P63、P16 表达的影响

浓度为 0.1, $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 康莱特注射液作用 HL-60/ADR 细胞 48 h 后,流式细胞仪检测细胞 P63 蛋白平均值分别为 878.04 ± 18.60 , 837.53 ± 42.75 。对照组为 591.33 ± 92.99 。P16 蛋白平均值分别为

853.74 ± 108.46 , 898.46 ± 36.50 。对照组为 698.45 ± 91.29 ,康莱特注射液作用过的 HL-60/ADR 细胞 P63, P16 表达较对照组均明显升高,统计学分析均有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

耐药性是否发生是影响急性白血病(AL)患者能否长期生存的重要因素,大量的临床研究资料显示介导AL耐药的机制除MDR发生外,细胞周期的调控异常也是引起AL耐药的重要机制之一。野生型P16蛋白作为CDKI家族中的一员,靠回钩状重叠的序列结合于CDK上远离cyclinD的位点,与周期素D(cyclinD)竞争结合CDK4CDK6或与周期素DCDK4CDK6复合物结合,抑制复合物的形成或其活性,进一步阻止视网膜母细胞瘤易感基因产物PRb的磷酸化,使之与转录因子E₂F结合,抑制转录,细胞停滞于G1期,以维持机体细胞的有序增殖和分化^[6]。当P16基因缺失或突变时, cyclinD与CDK4结合,催化Rb基因磷酸化,而磷酸化后的Rb基因丧失了对细胞增殖和分化的负性调控作用,由此引发细胞的恶性增殖^[7]。Okamoto等^[8]用P16互补脱氧核糖核酸(cDNA)的质粒转染肿瘤细胞系发现P16 cDNA质粒转染对肿瘤细胞克隆形成有明显抑制作用,此研究为P16基因的抑癌作用提供了较为直接的证据。大量研究资料显示白血病患者有P16基因表达异常,主要表现为P16基因水平降低,缺失和失活,过甲基化。范丽萍等^[9]应用巢式甲基化特异性聚合酶链反应分析了82例各种亚型的急性白血病患者在初诊或复发不同阶段P16基因的甲基化和缺失状态。结果显示82例急性白血病(AL)患者P16基因甲基化的出现率为39.0%,其中急性髓系白血病(AML)患者为41.4%,24例急性淋巴细胞白血病(ALL)患者为33.3%;初治AL患者为36.6%,而复发患者则为54.5%。82例AL患者中有6例P16基因缺失,缺失率为7.3%,在AML、ALL患者中分别为1.7%和20.8%。16例健康自愿者或非恶性血液病患者P16基因则未发生甲基化或缺失。结果提示P16基因表达异常与成人急性白血病的发生发展密切相关。程丽芳等^[10]对50例急性白血病患者P16基因mRNA表达水平进行研究时发现患者的P16基因mRNA表达水平明显低于正常人的P16 mRNA表达水平($P<0.001$)。其中急性淋巴细胞白血病mRNA表达水平又低于急性髓细胞性白血病($P<0.05$),初诊组中完全缓解组mRNA

表达水平高于未完全缓解组($P < 0.001$)。Strank等^[11]研究发现P16基因家族缺失率在白血病细胞25%~84%，明显高于原代白血病细胞，约为后者的3倍。且P16基因家族缺失率高的原代肿瘤细胞较缺失率低者容易建成细胞系^[12]。Arap等^[13]以磷酸钙沉淀的方法向5个体外培养的P16基因缺失的胶质瘤细胞系中转染P16基因，引起肿瘤细胞的生长抑制。Hama等^[14]亦通过向细胞系导入外源性P16基因，使细胞生长受到明显抑制。上述文献资料提示P16基因的低表达，缺失，失活，过甲基化与白血病的发生密切相关，应用P16基因提高肿瘤细胞P16蛋白的表达来治疗肿瘤可能是一个很有前途的治疗方案。本研究利用康莱特注射液作用HL-60/ADR 48 h后，检测到药物组细胞P16表达均明显高于对照组，但2组药物细胞P16蛋白表达无显著差异，提示康莱特注射液可上调P16蛋白的表达可能是其抗肿瘤机制之一，但其上调P16蛋白表达有无剂量关系有待进一步研究。

P63是近年发现的P53家族成员之一，P63蛋白广泛表达于人体正常组织中，增生的上皮细胞尤为显著。对各种上皮组织的发育、分化和形态发生上起重要作用，对于胚胎形成过程中外胚层的发育具有重要的意义。P63基因定位于人染色体3q²⁷⁻²⁹，转录后产生两类产物TAP63和 Δ NP63^[15]。TAP63激活P53靶基因，诱导细胞周期阻遏和引发细胞凋亡，表现有抑瘤作用，而 Δ NP63不具有转录激活活性，但它仍可以与DNA结合，并以显性失活的方式抑制TAP63和P63依赖的靶基因的转录，在大量人肿瘤的P63研究中发现更多的为 Δ NP63的癌基因功能，而不是P63的肿瘤抑制功能^[16]。Yamaguchi等^[17]对80例慢性髓细胞性白血病患者的P51/P63表达进行研究，发现其中74例P51/P63表达阳性。P51/P63表达的类型与临床分期无明显相关性，但有6例出现P51/TAP63突变。且慢性髓细胞性白血病急变期的P51/P63突变率(11.8%)较慢性期(1.5%)明显升高。本研究利用康莱特注射液作用HL-60/ADR48 h后，经过多次重复实验检测各组细胞P63表达，比较明确的是药物组细胞P63表达均明显高于对照组，但两药物组细胞P63蛋白表达无显著差异。对康莱特注射液影响HL-60/ADR细胞P63的表达有无剂量依赖关系及其类型的鉴别有待进一步研究，本研究结果结合文献资料，提示康莱特注射液抗肿瘤过程中影响到了P63蛋白的表达。

REFERENCES

- [1] LI D P. Recent progress in the anti-tumor mechanics of Kanglaite injection [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2001, 12(2): 122-124.
- [2] YU Y L, LI J R. Iducement of differentiation of HL-60 cells by Chinese medicine Kanglaite injection [J]. Pract J Cancer(实用癌症杂志), 2004, 19(3): 274-289.
- [3] YU Y L, LI J R. Kanglaite injection enhancing the inhibitory activity of adrimay on HL-60 cells[J]. Acta Acad Med Zunyi(遵义医学院学报), 2004, 27(4): 319-321.
- [4] YU Y L, LI J R. The mechanism of multidrug resistance reversal in HL-60/ADR cells by Chinese medicine Kanglaite injection [J]. Pract J Cancer(实用癌症杂志), 2006, 21(6): 573-575.
- [5] YU Y L, LI J R. The effect of Chinese medicine Kanglaite injection on expression of cyclinA in HL-60/ADR cells [J]. Acta Acad Med Zunyi(遵义医学院学报), 2007, 30(2): 113-115.
- [6] VILLARD J F, LACOMBE F, BELLLOC F, et al. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for ncology [J]. Cancer Radiother, 2001, 5(2): 109-129.
- [7] OTSUKI T, CLARK H M, JAFFE E S, et al. Involvement of CDKN2 (p16INK4A/MTS1) and p15INK4B/MTS2 in human leukemias and lymphomas [J]. Cancer Res, 1995, 55(7): 1436-1440.
- [8] OGAWA S, HANGAISHI A, MIYAWOKI S, et al. Loss of the cyclin-dependent kinase 4-inhibitor (p16; MTS1) gene is frequent in and highly specific to lymphoid tumors in primary human hematopoietic malignancies [J]. Blood, 1995, 86(4): 1548-1556.
- [9] FAN L P, SHEN J Z, YE B G, et al. Detection of p16 gene methylation status in adult patients with acute leukemia by using n-MSP [J]. J Exp Hematol(中国实验血液学杂志), 2007, 115(2): 258-261.
- [10] CHENG L F, YANG L, YIN L F, et al. The expression of P16 gene's mRNA in acute leukemia[J]. Med Pharm Yunnan(云南医药), 2008, 29 (3): 229-231.
- [11] STRANK G, HEIGHT S E, MITCHELL P, et al. Deletions and rearrangement of CDKN2 in lymphoid malignancy [J]. Blood, 1995, 85(4): 893-901.
- [12] NAKAO M, YOKOTA S, KANEKO H, et al. Alterations of CDKN2 gene structure in childhood acute lymphoblastic leukemia mutations of CDKN2 are observed preferentially in T lineage [J]. Leukemia, 1996, 10 (2): 249-254.
- [13] ARAP W, NISHIKAWA R, FURNARI F B, et al. Replacement of the p16/CDKN2 gene suppresses human glioma cell growth [J]. Cancer Res, 1995, 55(6): 1351-1354.
- [14] HAMA S, SADATOMO T, YOSHIOKA H, et al. Transformation of human glioma cell lines with p16 gene inhibits cell proliferation [J]. Anticancer Res, 1997, 17(3C): 1933-1938.
- [15] YANG A, KAGHAD M, WANG Y, et al. P63, p53 homolog at 3q 27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominantnegative activities [J]. Mol Cell. 1998, 2(3): 305-316.
- [16] LITTLE N A, JOCHEMSEN A G. P63 [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(1): 6-9.
- [17] YAMAGUCHI H, INOKUCHI K, SAKUMA Y, et al. Mutation of the p51/p63 gene is associated with blastic crisis in chronic myelogenous leukemia [J]. Leukemia, 2001, 15(11): 1729-1734.

收稿日期: 2009-07-03