

本文引用:肖蓬莉,郭淑利,王双琳,等. 三氧化二砷联合雷帕霉素对急性髓系白血病 THP-1 细胞增殖、凋亡及自噬的影响[J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(9): 818-823. DOI: 10. 7683/xyxyxb. 2020. 09. 003.

【基础研究】

三氧化二砷联合雷帕霉素对急性髓系白血病 THP-1 细胞增殖、凋亡及自噬的影响

肖蓬莉¹, 郭淑利¹, 王双琳^{1,2}, 刘思哲^{1,2}, 彭 靓¹, 王万里¹, 王松云¹, 王慧睿¹

(1. 郑州大学附属洛阳中心医院血液科, 河南 洛阳 471009; 2. 新乡医学院研究生院, 河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 探讨三氧化二砷(As_2O_3)单用或联合雷帕霉素(Rapa)对急性髓系白血病 THP-1 细胞增殖、凋亡和自噬的影响及其可能的分子机制。**方法** 将对数生长期急性髓系白血病 THP-1 细胞分为对照组、 As_2O_3 单药组、Rapa 单药组及 As_2O_3 + Rapa 组。 As_2O_3 、Rapa 单药组分别应用终浓度 0.75、1.50、3.00、6.00、12.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As_2O_3 以及 10、20、40、80、160 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 干预细胞, As_2O_3 + Rapa 组细胞给予 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As_2O_3 和 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 干预, 对照组细胞采用正常培养基培养。应用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As_2O_3 + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 联合用药对 THP-1 细胞的增殖抑制率; 流式细胞术检测各组 THP-1 细胞的凋亡率; 实时荧光定量聚合酶链反应检测各组 THP-1 细胞中自噬相关基因 Beclin1、LC3 和 p62 mRNA 的表达; Western blotting 检测各组 THP-1 细胞中自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)-II/LC3-I 的表达。**结果** As_2O_3 单独用药和 Rapa 单独用药时, 随着药物浓度增加对急性髓系白血病 THP-1 细胞的增殖抑制作用逐渐增强, 呈剂量依赖关系($P < 0.05$)。 As_2O_3 和 Rapa 对急性髓系白血病 THP-1 细胞的 IC_{50} 分别为 5.794 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 77.274 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; As_2O_3 + Rapa 组急性髓系白血病 THP-1 细胞增殖抑制率显著高于 As_2O_3 、Rapa 单药组($P < 0.05$); 与 As_2O_3 、Rapa 单药组比较, As_2O_3 + Rapa 组 THP-1 细胞中自噬相关基因 Beclin-1 和 LC3 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$), p62 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$)。与 As_2O_3 和 Rapa 单药组比较, As_2O_3 + Rapa 组 THP-1 细胞中 LC3-II/LC3-I 比值显著增高($P < 0.05$)。**结论** As_2O_3 联合 Rapa 可协同抑制 THP-1 细胞增殖, 诱导 THP-1 细胞凋亡, 其效应可能通过引起 THP-1 细胞过度自噬实现。

关键词: 三氧化二砷; 雷帕霉素; THP-1 细胞; 增殖; 凋亡; 自噬

中图分类号: R714.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2020)09-0818-06

Effects of arsenic trioxide combined with rapamycin on proliferation, apoptosis and autophagy of acute myeloid leukemia THP-1 cells

XIAO Pengli¹, GUO Shuli¹, WANG Shuanglin^{1,2}, LIU Sizhe^{1,2}, PENG Liang¹, WANG Wanli¹, WANG Songyun¹, WANG Huirui¹

(1. Department of Hematology, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang 471009, Henan Province, China; 2. Graduate School, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of arsenic trioxide (As_2O_3) combined with rapamycin(Rapa) on the proliferation, apoptosis and autophagy of acute myeloid leukemia THP-1 cells, and investigate the underlying mechanisms. **Methods** The THP-1 cells in the logarithmic growth stage were divided into the control group, the As_2O_3 treatment group, the Rapa treatment group and the As_2O_3 + Rapa group. The As_2O_3 treatment group and the Rapa treatment group were treated with 0.75, 1.50, 3.00, 6.00, 12.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As_2O_3 and 10, 20, 40, 80 and 160 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa, respectively; the cells in As_2O_3 + Rapa group were treated with 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As_2O_3 and 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa; the cells in blank control group were cultured in normal medium. The inhibitory effects of As_2O_3 and Rapa alone, as well as in a combination of As_2O_3 and Rapa on THP-1 cell proliferation were detected by using cell counting kit-8 method; the apoptosis of THP-1 cells in the blank control group, As_2O_3 treatment group, Rapa treatment group and As_2O_3 + Rapa group was detected by using flow cytometry; the expressions of autophagy associated gene Beclin1, microtubule-associated 1 light chain 3 (LC3) and p62 mRNA and protein in THP-1 cells in the four groups were measured by using real-time quantitative polymerase chain reaction and Western blotting, respectively.

Results The growth inhibition rate of As_2O_3 or Rapa alone on the cell proliferation increased with the augment of drug concentration in a concentration-dependent manner($P < 0.05$). The IC_{50} of As_2O_3 and Rapa on THP-1 cells were 5.794 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 77.274 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The cell proliferation inhibition rate and apoptosis ratio in the As_2O_3 + Rapa group were significantly higher than those in the As_2O_3 treatment group and the Rapa treatment group ($P < 0.05$). The expression of

DOI: 10. 7683/xyxyxb. 2020. 09. 003

收稿日期: 2019-12-31

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(编号: 2018020905, SB201903035); 洛阳市科技计划医疗卫生项目(编号: 1910014A)。

作者简介: 肖蓬莉(1989-), 女, 河南洛阳人, 硕士, 检验师, 研究方向: 急性髓系白血病的发病机制及防治。

通信作者: 王慧睿(1978-), 女, 河南洛阳人, 博士, 副教授, 主任医师, 研究方向: 急性髓系白血病的发病机制及防治; E-mail: wanghuirui7873@163.com。

autophagy related genes Beclin-1, LC-3 mRNA in the THP-1 cells in the As₂O₃ + Rapa group were significantly higher than those in the As₂O₃ treatment group and the Rapa treatment group ($P < 0.05$), the expression of p62 mRNA was significantly lower than that in the As₂O₃ treatment group and the Rapa treatment group ($P < 0.05$). The ratio of LC3-II/LC3-I in the As₂O₃ + Rapa group was significantly higher than that in the As₂O₃ treatment group and the Rapa treatment group ($P < 0.05$).

Conclusion Combination of As₂O₃ and Rapa can inhibit THP-1 cell proliferation, induce THP-1 cell apoptosis, which may be achieved by inducing excessive autophagy of THP-1 cells.

Key words: arsenic trioxide; rapamycin; THP-1 cell; proliferation; apoptosis; autophagy

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是临床最常见的血液系统恶性肿瘤之一。尽管目前临床所采用的化学治疗或造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)等方法在AML的治疗方面取得了较大进展,但仍有一部分患者会出现难治或复发^[1]。此外,治疗费用高、HSCT配型困难、不良反应多等不利因素也影响了这些治疗方法的临床应用。因此,有必要寻找新型治疗药物。三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)是中药砒霜的主要成分,我国学者将As₂O₃用于急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)的靶向治疗取得了巨大成功^[2]。有研究表明,As₂O₃不仅对APL具有显著疗效,对多种恶性血液病细胞也有显著的抑制增殖和促进凋亡作用^[2-3]。As₂O₃可协同促进其他药物的药效,提高放射治疗、化学治疗的敏感性,且可通过诱导自噬使肿瘤细胞凋亡^[4],但As₂O₃单独使用临床效果有限。雷帕霉素(rapamycin, Rapa)最初是一种抗真菌抗生素和免疫抑制剂,主要用于器官移植后急性排斥反应的防治。有文献报道,恶性血液肿瘤存在雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路的异常激活,而Rapa能特异性结合并抑制哺乳动物mTOR的活性,诱导自噬发生^[5-6]。Rapa对多种肿瘤如非小细胞性肾癌、乳腺癌等有一定治疗作用,但单独使用抗肿瘤效果并不明显,可能是因为其他分子信号通路被激活^[7-8]。因此,本研究拟探讨As₂O₃与Rapa联合用药对AML细胞株THP-1细胞增殖、凋亡和自噬的影响,以期为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 人急性髓系白血病 THP-1 细胞株购自中国科学院细胞库,液氮冷冻保存;As₂O₃ 购自北京双鹭药业股份有限公司,Rapa 购自美国 Selleck Chemicals 公司,RPMI-1640 和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、二喹啉甲酸 (bicinchoninic

acid, BCA) 购自上海碧云天生物技术有限公司,膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙锭 (propidium iodide, PI) 凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,TRIzol、反转录试剂盒和 SYBR green 荧光染料购自大连 TaKaRa 公司,引物由上海生工生物工程有限公司合成,微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 抗体购自美国 Abcam 公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自杭州华安生物技术有限公司,增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 检测试剂购自美国 Millipore 公司;超净工作台、CO₂ 培养箱、多功能酶标仪、冷冻离心机购自美国 Thermo 公司,荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购自美国 ABI 公司,流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 THP-1 细胞株培养于含体积分数 10% 胎牛血清、10⁵ U · L⁻¹ 青霉素、100 mg · L⁻¹ 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,每 2 ~ 3 d 换液并传代。

1.2.2 CCK-8 检测各组细胞的增殖抑制率 选取浓度为 0.75、1.50、3.00、6.00、12.00 μmol · L⁻¹ As₂O₃ 以及 10、20、40、80、160 nmol · L⁻¹ Rapa 进行预试验以确定 As₂O₃ 和 Rapa 联合用药浓度及培养时间。取对数生长期 THP-1 细胞,调整细胞密度为 2 × 10⁸ L⁻¹,接种于 96 孔板,每孔 100 μL,加入不同浓度的 As₂O₃ 和 Rapa,使 As₂O₃ 的终浓度分别为 0.75、1.50、3.00、6.00、12.00 μmol · L⁻¹,Rapa 的终浓度分别为 10、20、40、80、160 nmol · L⁻¹,每个浓度设 4 个复孔,同时设不加药培养的 THP-1 细胞为对照孔,另设不含细胞的培养液为空白孔,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养 24、48 h 后,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,在培养箱孵育 4 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值,计算各组细胞的增殖抑制率,细胞增殖抑制率

(%) = $[1 - (A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%$, 再计算半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC_{50}), $IC_{50} = \lg - 1 [X_m - i (\sum P - 0.5)]$ (X_m : 最大浓度的对数值; i : 各浓度倍比浓度的对数值; $\sum P$: 各组生长抑制率之和; 0.5: 经验常数)。根据预实验结果, 选择对 THP-1 细胞增殖抑制作用较弱的 24 h 作为后续实验作用时间。As₂O₃、Rapa 对 THP-1 细胞作用 24 h 的 IC_{50} 分别为 $5.794 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $77.274 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 因此选择 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 和 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 联合用药, 设置 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 单药组、 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 单药组及 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组, 并应用 CCK-8 检测各组细胞增殖抑制率。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 应用 AnnexinV-FITC/PI 双染法进行检测。取对数生长期 THP-1 细胞, 随机分为对照组、As₂O₃ 单药组、Rapa 单药组及 As₂O₃ + Rapa 组, 对照组不加任何药物干预, As₂O₃ 单药组给予 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 干预, Rapa 单药组给予 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 干预, As₂O₃ + Rapa 组给予 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 和 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 联合干预; 各组加入相应浓度的药物混匀, 调整细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 每孔 2 mL 接种于 6 孔板, 置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24 h 后, 收集各组细胞, 使用预冷磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤, 用 $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞, 使细胞的密度达到 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 每管加入 100 μL 细胞 (1×10^5 个), 加入 5 μL Annexin V-FITC 轻轻地混匀, 室温条件下避光孵育 10 min; 随后加入 5 μL PI, 用移液枪混匀, 室温条件下避光孵育 5 min, 最后加入 PBS 至 500 μL , 轻轻混匀, 在 1 h 内用流式细胞仪检测, 实验重复 3 次, 取均值。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测自噬相关基因 mRNA 表达水平 取对数生长期 THP-1 细胞, 随机分为对照组、As₂O₃ 单药组、Rapa 单药组及 As₂O₃ + Rapa 组, 对照组不加任何药物干预, As₂O₃ 单药组给予 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 干预, Rapa 单药组给予 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 干预, As₂O₃ + Rapa 组给予 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 和 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 联合干预; 各组加入相应浓度的药物混匀, 调整细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 每孔 2 mL 接种于 6 孔板, 置于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24 h 后, 收集各组细胞, 总 RNA 提取和纯化按照 TRIzol 说明书进行。应用反转录试剂盒将

1 μg RNA 反转录为 cDNA, 随后使用 SYBR Green qRT-PCR 试剂盒进行 qRT-PCR 反应, 检测 Beclin1、LC3、p62 mRNA 表达。内参 GAPDH 上游引物序列为 5'-CCAGCAAGAGCACAAGAGGAA-3', 下游引物序列为 5'-CAAGGGGTCTACATGGCAACT-3'; Beclin1 上游引物序列为 5'-GAGGGATGGAAGGGTCTAAG-3', 下游引物序列为 5'-GCCTGGGCTGTGCTAACT-3'; LC3 上游引物序列为 5'-GTTGGTCAAGATCATCCGGC-3', 下游引物序列为 5'-TCAGAAGCCGAAGGTTTCCT-3'; p62 上游引物序列为 5'-GGGACTTGTTGCCTTTT-3', 下游引物序列为 5'-CAGCCATCGCAGATCACATT-3'。扩增条件如下, 第 1 阶段: 预变性 (95 ℃ 30 s); 第 2 阶段: PCR 反应 (95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s) 40 个循环; 第 3 阶段: 溶解曲线分析 (95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 15 s)。qRT-PCR 检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析。

1.2.5 Western blotting 检测 THP-1 细胞中自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 的表达情况 取对数生长期 THP-1 细胞, 随机分为对照组、As₂O₃ 单药组、Rapa 单药组及 As₂O₃ + Rapa 组, 对照组不加任何药物干预, As₂O₃ 单药组给予 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 干预, Rapa 单药组给予 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 干预, As₂O₃ + Rapa 组给予 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 和 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 联合干预; 各组加入相应浓度的药物混匀, 调整细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 每孔 2 mL 接种于 6 孔板, 置于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24 h 后收集细胞, PBS 洗涤后在各组 THP-1 细胞中加入细胞裂解液提取总蛋白, 使用 BCA 进行蛋白定量, 各组使用等量总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺钠凝胶电泳法 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳, 常规转膜; 聚偏氟乙烯膜 (polyvinylidene fluo-ride, PVDF) 经室温体积分数 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 加入 LC3 (一抗稀释比例为 1 : 1 500) 抗体 4 ℃ 孵育过夜; 次日洗膜 3 次后加入二抗 (二抗稀释比例为 1 : 5 000) 室温孵育 1 h, 洗膜 3 次后, ECL 检测试剂与膜作用, 在暗室中曝光, X 射线显影、定影, Image J 软件分析条带的灰度值。以 GAPDH 为内参对目的蛋白进行灰度值半定量分析。实验重复 3 次, 取平均值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 As₂O₃ 和 Rapa 对 THP-1 细胞增殖的抑制作用及 IC₅₀ 的筛选 结果见表 1 和表 2。不同浓度 As₂O₃ 和 Rapa 组 THP-1 细胞增殖抑制率均高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随药物浓度增加,As₂O₃ 和 Rapa 对 THP-1 细胞的增殖抑制作用逐渐增强,呈剂量依赖关系($P < 0.05$)。对照组、3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组、40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组及 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组细胞增殖抑制率分别为 $(0.000 \pm 0.000)\%$ 、 $(31.705 \pm 1.266)\%$ 、 $(27.562 \pm 1.888)\%$ 、 $(48.253 \pm 1.052)\%$,与 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组和 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组比较,3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组细胞增殖抑制率显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 As₂O₃ 对 THP-1 细胞增殖的抑制作用
Tab.1 Inhibitory effect of As₂O₃ on THP-1 cells proliferation
($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞增殖抑制率/%	
		24 h	48 h
对照组	3	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
0.75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As ₂ O ₃ 组	3	10.750 ± 1.768 ^a	18.265 ± 2.468 ^a
1.50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As ₂ O ₃ 组	3	19.451 ± 1.485 ^{ab}	30.055 ± 2.185 ^{ab}
3.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As ₂ O ₃ 组	3	27.852 ± 1.485 ^{abc}	40.155 ± 1.478 ^{abc}
6.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As ₂ O ₃ 组	3	39.811 ± 1.697 ^{abcd}	51.495 ± 0.997 ^{abcd}
12.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As ₂ O ₃ 组	3	56.312 ± 1.131 ^{abcde}	65.011 ± 1.117 ^{abcde}

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与 0.75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组比较^b $P < 0.05$;与 1.50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组比较^c $P < 0.05$;与 3.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组比较^d $P < 0.05$;与 6.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组比较^e $P < 0.05$ 。

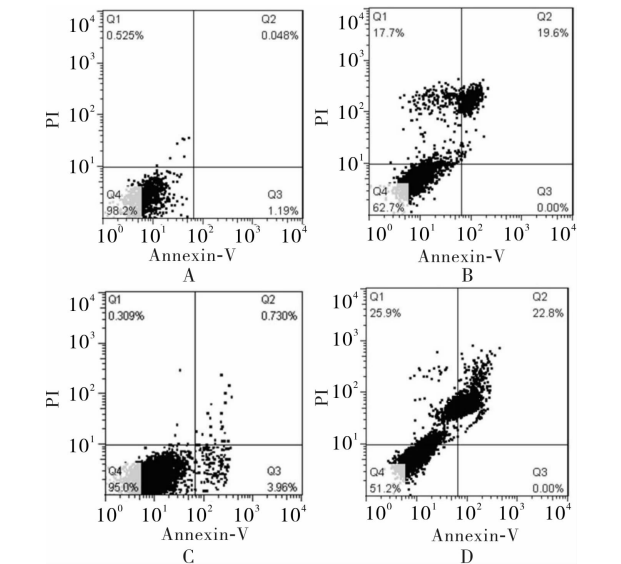
表 2 Rapa 对 THP-1 细胞增殖的抑制作用
Tab.2 Inhibitory effect of Rapa on THP-1 cells proliferation
($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞增殖抑制率/%	
		24 h	48 h
对照组	3	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
10 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组	3	9.760 ± 1.754 ^a	11.805 ± 0.983 ^a
20 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组	3	18.155 ± 0.912 ^{ab}	25.052 ± 1.336 ^{ab}
40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组	3	27.762 ± 1.747 ^{abc}	36.506 ± 1.406 ^{abc}
80 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组	3	38.952 ± 0.771 ^{abcd}	45.007 ± 1.122 ^{abcd}
160 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组	3	47.056 ± 0.911 ^{abcde}	51.607 ± 1.706 ^{abcde}

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与 10 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组比较^b $P < 0.05$;与 20 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组比较^c $P < 0.05$;与 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组比较^d $P < 0.05$;与 80 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组比较^e $P < 0.05$ 。

2.2 As₂O₃、Rapa 单用及二者联合用药对 THP-1 细胞凋亡的诱导作用 结果见图 1。对照组、3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组、40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组和 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组细胞凋亡率分别为 $(1.47 \pm 0.49)\%$ 、 $(4.72 \pm 0.67)\%$ 、 $(35.76 \pm 2.78)\%$ 、 $(54.13 \pm 4.90)\%$,3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ +

40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组细胞凋亡率显著高于对照组、3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组和 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



A:对照组;B:3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组;C:40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组;D:3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组。

图 1 对照组、3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组、40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组和 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组作用 24 h 后 THP-1 细胞凋亡率

Fig.1 Apoptosis rate of THP-1 cells at 24 h in the control group,3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ group,40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa group and 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa group

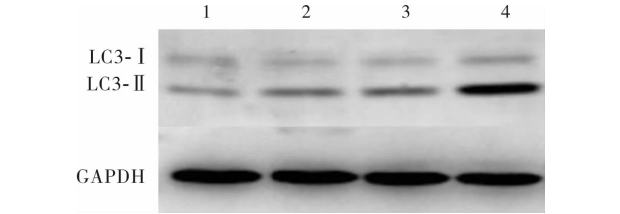
2.3 As₂O₃、Rapa 单用及二者联合用药对 THP-1 细胞自噬相关基因和蛋白表达的影响 结果见表 3 和图 2。与对照组比较,3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组、40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组及 3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组 THP-1 细胞中自噬相关基因 Beclin-1、LC3 mRNA 相对表达量显著增加($P < 0.05$),p62 mRNA 相对表达量显著降低($P < 0.05$);3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组 THP-1 细胞中 Beclin-1、LC3 mRNA 相对表达量显著高于 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组和 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组($P < 0.05$),p62 mRNA 相对表达水平显著低于 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组和 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组($P < 0.05$)。对照组、3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组、40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组和 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组 THP-1 细胞中 LC3-II/LC3-I 比率分别为 1.385 ± 0.477 、 2.118 ± 0.558 、 3.731 ± 1.505 、 4.995 ± 0.177 ,3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组、40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组及 3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组 THP-1 细胞中 LC3-II/LC3-I 比率均显著高于对照组($P < 0.05$),3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ + 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组 THP-1 细胞中 LC3-II/LC3-I 比率显著高于 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ 组和 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 组($P < 0.05$)。

表 3 4 组 THP-1 细胞中 Beclin-1、LC3、p62 mRNA 相对表达量比较

Tab.3 Comparison of relative expression of Beclin-1,LC-3 and p62 mRNA in THP-1 cells among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Beclin-1 mRNA	LC-3 mRNA	p62 mRNA
对照组	3	0.997 ± 0.195	0.997 ± 0.115	0.997 ± 0.075
3 μmol · L ⁻¹ As ₂ O ₃ 组	3	1.443 ± 0.111 ^a	1.827 ± 0.155 ^a	0.790 ± 0.082 ^a
40 nmol · L ⁻¹ Rapa 组	3	1.630 ± 0.092 ^a	2.147 ± 0.291 ^a	0.603 ± 0.045 ^a
3 μmol · L ⁻¹ As ₂ O ₃ + 40 nmol · L ⁻¹ Rapa 组	3	2.057 ± 0.080 ^{abc}	3.357 ± 0.391 ^{abc}	0.417 ± 0.031 ^{abc}

注:与对照组比较^a*P* < 0.05;与 3 μmol · L⁻¹ As₂O₃ 组比较^b*P* < 0.05;与 40 nmol · L⁻¹ Rapa 组比较^c*P* < 0.05。



1:对照组;2;3 μmol · L⁻¹ As₂O₃ 组;3;40 nmol · L⁻¹ Rapa 组;4: 3 μmol · L⁻¹ As₂O₃ + 40 nmol · L⁻¹ Rapa 组。

图 2 对照组、3 μmol · L⁻¹ As₂O₃ 组、40 nmol · L⁻¹ Rapa 组和 3 μmol · L⁻¹ As₂O₃ + 40 nmol · L⁻¹ Rapa 组 THP-1 细胞中 LC3-I、LC3-II 蛋白表达水平 (Western blotting)
Fig.2 Expression of LC3-I,LC3-II protein in THP-1 cells in the control group, the 3 μmol · L⁻¹ As₂O₃ group, the 40 nmol · L⁻¹ Rapa group and the 3 μmol · L⁻¹ As₂O₃ + 40 nmol · L⁻¹ Rapa group (Western blotting)

3 讨论

AML 作为高度异质性恶性血液肿瘤,由于肿瘤细胞克隆演变可导致疾病复发以及对现有治疗药物耐药^[1],积极探寻新型有效药物和作用模式成为进一步提高 AML 临床疗效和改善其预后的重要途径。

越来越多的研究表明,As₂O₃ 在多种急性白血病的 治疗中有效,但由于白血病细胞耐药和激活负反馈 调节通路等导致 As₂O₃ 的单药作用有限或者所需剂 量较高从而伴随严重毒副作用^[2-3]。本研究将 As₂O₃ 单药作用于THP-1细胞,当 As₂O₃ 作用浓度较高时才能有效抑制 THP-1 细胞的增殖。因此,寻找减轻其毒 副作用的增敏剂,与 As₂O₃ 联用,增强其治疗作用、降 低使用剂量,是拓宽 As₂O₃ 在急性白血病临床应用范 围的重要手段。

近年,自噬成为肿瘤治疗的新靶点,其中针对自 噬信号通路中关键分子 mTOR 的靶向治疗已在临 床开展^[9]。Rapa 在 B 细胞恶性肿瘤中的研究表明, 在体外 Rapa 可有效抑制套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma,MCL)和弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma,DLBCL)细胞系及患者肿瘤原 代细胞的增殖,但在临床试验中该部分患者对 Rapa 类似物的反应有限^[10-11]。在 Rapa 类似物依维莫司 治疗复发性淋巴瘤的Ⅱ期临床试验中,DLBCL 的总 反应率仅为 30% (14/47)^[12];在替西罗莫司的临床 试验观察到类似的结果,DLBCL 的总反应率仅为

28%^[13]。国内也有研究发现,Rapa 单药对 K562 细 胞株、HL-60 细胞株、CEM 细胞株的增殖抑制作用 均较弱,联合柔红霉素或硼替佐米可增强其抗肿瘤 效应^[14]。本研究结果也提示,Rapa 单药对 THP-1 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用均较弱。在 Rapa 类似物联合化学治疗的临床试验中,替西罗莫司联 合天冬酰胺酶化学治疗可提高多次复发儿童急性淋 巴细胞白血病患者缓解率,但随药物剂量累积造 成药物毒性增强,从而导致患儿耐受性差^[15];而在 另一项临床试验中,依维莫司联合强的挽救性化学 治疗并未提高急性 B 淋巴细胞白血病的缓解率^[16]。 可见,目前 Rapa 与其他药物联合在白血病治疗中的 临床效果尚不确切,在 AML 中的研究也较少,因此探 索在 AML 治疗中可与 Rapa 发挥有效协同作用且不增 加毒性的药物尤为关键。

自噬是 As₂O₃ 发挥抗肿瘤作用的关键机制, As₂O₃ 可诱导伯基特淋巴瘤细胞 Raji 发生自噬,同 时下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达^[17]。As₂O₃ 通过 mTOR 依赖的自噬信号通路促使 AML-M3 型急性早 幼粒细胞进入一种新的细胞死亡途径—— ETosis^[18]。As₂O₃ 还可通过诱导自噬发生来降解 BCR-ABL 融合基因,从而发挥抗肿瘤作用^[19]。本 研究结果也表明,As₂O₃ 可诱导 THP-1 细胞发生自 噬,自噬相关基因 Beclin-1、LC3 mRNA 相对表达量 增加、p62 mRNA 相对表达量降低,同时自噬相关蛋 白 LC3- I 向 LC3- II 转变增加。此外,TAI 等^[20]研究 发现,As₂O₃ 和 Rapa 在前列腺癌细胞中发挥协同作 用,诱导前列腺癌细胞的凋亡,As₂O₃ 和 Rapa 协同 上调 Beclin-1、LC3- II,诱导自噬发生可能是其潜在 机制。LI 等^[17]研究发现,Rapa 可增强 As₂O₃ 诱导 的自噬活性,下调抗凋亡基因 Bcl-2 和上调 p53 基 因表达,增强 As₂O₃ 对 Raji 细胞的杀伤效应、增加 Raji 细胞对 As₂O₃ 的敏感性。本研究结果与以上研 究报道相似,与单药相比,以低于 IC₅₀ 值的 As₂O₃ 与 Rapa 联合用药可提高 THP-1 细胞增殖抑制率及凋 亡率,同时联合用药组细胞自噬活性也明显增加。

综上所述,As₂O₃ 联合 Rapa 可协同抑制 THP-1 细胞的增殖,诱导 THP-1 细胞的凋亡,其效应可能 是通过引起 THP-1 细胞过度自噬实现,但 As₂O₃ 联 合 Rapa 的临床前试验或临床试验尚需进一步探索。

参考文献:

[1] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017 年版)[J]. 中华血液学杂志,2017,38(3):177-182.

[2] 赵维莅,陈赛娟. 砷剂治疗白血病-人类肿瘤靶向治疗的新模式[J]. 中华医学杂志,2005,85(7):439-440.

[3] 张彦平,刘蒙蒙,展新荣. 地西他滨联合三氧化二砷治疗老年急性髓系白血病的疗效及安全性[J]. 新乡医学院学报,2019,36(12):1163-1166.

[4] MOOSAVI M A, DJAVAHERI-MERGNY M. Autophagy: new insights into mechanisms of action and resistance of treatment in acute promyelocytic leukemia[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(14):3559.

[5] XIA P,XU X Y. PI3k/AKT/mTOR signaling pathway in cancer stem cells;from basic research to clinical application[J]. *Am J Cancer Res*,2015,5(5):1602-1609.

[6] 刘晓蕾,刘丽英. 自噬在儿童急性淋巴细胞白血病发生中的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志,2017,32(15):1184-1186.

[7] GHIDINI M,PETRELLI F,GHIDINI A,*et al.* Clinical development of mTOR inhibitors for renal cancer[J]. *Expert Opin Investig Drugs*,2017,26(11):1229-1237.

[8] LEE J J,LOH K,YAP Y S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer[J]. *Cancer Biol Med*,2015,12(4):342-354.

[9] KOCATURK N M,AKKOC Y,KIG C,*et al.* Autophagy as a molecular target for cancer treatment[J]. *Eur J Pharm Sci*,2019,134:116-137.

[10] DAL COL J,ZANCAI P,TERRIN L,*et al.* Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma[J]. *Blood*,2008,111(10):5142-5151.

[11] WANNER K,HIPP S,OELSNER M,*et al.* Mammalian target of rapamycin inhibition induces cell cycle arrest in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cells and sensitises DLBCL cells to rituximab[J]. *Br J Haematol*,2006,134(5):475-484.

[12] WITZIG T E,REEDER C B,LAPLANT B R,*et al.* A phase II

trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed aggressive lymphoma[J]. *Leukemia*,2011,25(2):341-347.

[13] SMITH S M,VAN BESIEEN K,KARRISON T,*et al.* Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes;the University of Chicago phase II consortium[J]. *J Clin Oncol*,2010,28(31):4740-4746.

[14] 杨曦,龚玉萍,杨雷. 雷帕霉素单药及联合硼替佐米、柔红霉素对白血病细胞株抗肿瘤效应的研究[J]. 中华血液学杂志,2010,31(3):201-203.

[15] RHEINGOLD S R,TASIAN S K,WHITLOCK J A,*et al.* A phase I trial of temsirolimus and intensive re-induction chemotherapy for 2nd or greater relapse of acute lymphoblastic leukaemia;a Children's Oncology Group study (ADVL1114)[J]. *Br J Haematol*,2017,177(3):467-474.

[16] DAVER N,BOUMBER Y,KANTARJIAN H,*et al.* A Phase I/II study of the mTOR inhibitor everolimus in combination with hyperCVAD chemotherapy in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*,2015,21(12):2704-2714.

[17] LI C L,WEI H L,CHEN J,*et al.* Arsenic trioxide induces autophagy and antitumor effects in Burkitt's lymphoma Raji cells[J]. *Oncol Rep*,2014,32(4):1557-1563.

[18] LI T,MA R,ZHANG Y,*et al.* Arsenic trioxide promoting ETosis in acute promyelocytic leukemia through mTOR-regulated autophagy[J]. *Cell Death Dis*,2018,9(2):75.

[19] GOUSSETIS D J,GOUNARIS E,WU E J,*et al.* Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of anti-leukemic responses byarsenic trioxide[J]. *Blood*,2012,120(17):3555-3562.

[20] TAI S,XU L,XU M,*et al.* Combination of arsenic trioxide and everolimus (Rad001) synergistically induces both autophagy and apoptosis in prostate cancer cells[J]. *Oncotarget*,2017,8(7):11206-11218.

(本文编辑:周二强)

(上接第 817 页)

[6] UURTO I,JUUTI H,PARKKINEN J,*et al.* Biodegradable self-expanding poly-L/D-lactic acid vascular stent;a pilot study in canine and porcine iliac arteries[J]. *J Endovasc Ther*,2004,11(6):712-718.

[7] BAO Q H. Microstructure,mechanical and corrosion properties of Mg-Y-Ca-Zn alloy for biomedical applications[J]. *J Biomime Biomater T Eng*,2013,17:45-51.

[8] 林正捷,赵颖,张志雄,等. 医用可降解镁合金抗菌性、溶血以及生物相容性的研究进展[J]. 稀有金属材料与工程,2018,47(1):403-408.

[9] BÎRCĂA C,NEACȘU I A,VASILE O R,*et al.* Mg-Zn alloys,most suitable for biomedical applications[J]. *Rom J Morphol Embryol*,2018,59(1):49-54.

[10] ZHANG M,CAI S,ZHANG F,*et al.* Preparation and corrosion resistance of magnesium phytic acid/hydroxyapatite composite coatings on biodegradable AZ31 magnesium alloy[J]. *J Mater Sci Mater Med*,2017,28(6):82.

[11] CUI X,LI Y,LI Q,*et al.* Influence of phytic acid concentration on performance of phytic acid conversion coatings on the AZ91D magnesium alloy[J]. *Mater Chem Technol*,2008,111(2/3):503-507.

[12] GUPTA R K,MENSAH-DARKWA K,KUMAR D. Effect of post heat treatment on corrosion resistance of phytic acid conversion coated magnesium[J]. *J Mater Sci Technol*,2013,29(2):180-186.

[13] 袁广银,张佳,丁文江. 可降解医用镁基生物材料的研究进展[J]. 中国材料进展,2011,30(2):44-50.

[14] 姜东梅. Mg-Zn-Ca-Zr/Nd/Y 生物镁合金组织、力学性能和腐蚀行为研究[D]. 长春:吉林大学,2014.

[15] 张佳,宗阳,付彭怀,等. 镁合金在生物医用材料领域的应用及发展前景[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009(29):5747-5750.

[16] 李涛,张海龙,何勇,等. 生物医用镁合金研究进展[J]. 功能材料,2013,44(20):2913-2918.

[17] 王啸虎,阎钧,陈义刚,等. 生物可降解镁合金临床应用研究进展[J]. 材料导报,2013,27(21):93-96.

[18] CHEN J,TAN L,YU X,*et al.* Mechanical properties of magnesium alloys for medical application;a review[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*,2018,87:68-79.

(本文编辑:孟 月)