

# 地西他滨联合丙戊酸钠对白血病细胞株的促分化效应研究

刘波<sup>1</sup>, 邬露丹<sup>2</sup>(1.宁波市第九医院, 浙江 宁波 315020; 2.宁波市医疗中心李惠利医院, 浙江 宁波 315040)

**摘要:** 目的 探讨地西他滨(decitabine,DCA)和丙戊酸钠(valproic acid,VPA)联用对白血病细胞株 HL-60 的促分化影响。方法 设立分组如下: 对照组, DCA A 组( $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), DCA B 组( $4.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), VPA 组( $2.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 联合用药 A 组(DCA  $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +VPA  $2.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 联合用药 B 组(DCA  $4.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +VPA  $2.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 作用 48 h。流式细胞术检测 CD34、CD117 MFI 以及 CD11b、CD14 表达率。结果 联合用药 A、B 组的 CD117 和 CD34 MFI 显著低于其各自的单药组( $P<0.01$ ); 联合用药 A 组的 CD11b 和 CD14 表达率和联合用药 B 组 CD11b 表达率显著低于其各自的单药组( $P<0.01$ )。结论 VPA 与 DCA 联用对 HL-60 细胞具促分化作用。

**关键词:** 分化抗原; HL-60 细胞; 丙戊酸钠; 地西他滨

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)06-0486-04

## Synergistic Effect of Decitabine and Valproic Acid on Induction of Differentiation in Leukemic HL-60 Cells

LIU Bo<sup>1</sup>, WU Ludan<sup>2</sup>(1.Ningbo No.9 Hospital, Ningbo 315020, China; 2.Ninbo Medical Treatment Center Lihui Hospital, Ningbo 315040, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the synergistic effect of decitabine(DCA) and valproic acid(VPA) in differentiation induction in leukemic HL-60 cells. **METHODS** The drug groups were set as follows: control group; DCA group A( $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); DCA group B( $4.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); VPA group( $2.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); combination group A(DCA  $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +VPA  $2.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); combination group B(DCA  $4.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +VPA  $2.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The cells were treated for 48 h. The CD117, CD34 mean fluorescence intensity(MFI) and CD14, CD11b expression were detected by flow cytometry. **RESULTS** The CD117, CD34 MFI of combination group A and B were significantly lower than their corresponding concentration single drug group( $P<0.01$ ). Except CD14 of combination group B, the CD14, CD11b expressions of combination group A and B were significantly lower than their corresponding concentration single drug group( $P<0.01$ ). **CONCLUSION** There is an enhanced differentiation activity of combinations of DCA and VPA in HL-60 cells.

**KEY WORDS:** differntiation antigen; HL-60; Valproic acid; Decitabine

作者简介: 刘波, 男, 副主任技师 Tel: (0574)56803706 E-mail: 91liubo@163.com

地西他滨(decitabine, DCA)为 5-杂氮-2'-脱氧胞苷, 为一种去甲基化药物, 用于中高危骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS) 的治疗。DCA 单用治疗 MDS 效果已超越传统治疗手段<sup>[1-2]</sup>。MDS 一般在数月甚至数年内转化为急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML), 且部分类别的核型异常的 MDS 进展为 AML 的可能性更大<sup>[3]</sup>。AML 虽和 MDS 一样是高甲基化的血液系统肿瘤, 但 DCA 对于 AML 治疗效果不如对 MDS 稳定和敏感, 存在较大的个体差异。国外有报道显示, DCA 单药治疗 AML 不如与组蛋白去乙酰化酶抑制剂药物如丙戊酸钠(valproic acid, VPA) 等联合使用<sup>[4]</sup>。目前较多的报道集中在 DCA 联合 VPA 的体外促抑癌基因的表达<sup>[5-6]</sup>, 但体外对细胞分化抗原的表达调控报道不多, 笔者通过 DCA 联合 VPA 作用于 AML 细胞株 HL-60, 观察其体外对细胞分化抗原的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和试剂

地西他滨(5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷粉剂)购自 Sigma; 注射用丙戊酸钠(德巴金)购自赛诺菲-安万特公司; AML 细胞株 HL-60 购自中科院上海细胞库; CD34-FITC、CD117-PE、CD11b、CD14-FITC 均购自美国 BD 公司; CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Jouan IG150); 流式细胞仪(美国 BD FACSCalibur); 获取软件为 CellQuest。

### 1.2 细胞培养及药物处理

HL-60 采用含 10% 小牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素、100 U·mL<sup>-1</sup> 链霉素的 RPMI 1640 培养液在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 取对数期细胞备用。配制浓度为 1×10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的细胞悬液接种于 6 孔培养板, 每孔 2 mL, 置 37 °C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养过夜。在前期预实验中, 笔者观察了 DCA 和 VPA 的单药孵育 48 h 的 IC<sub>50</sub>, 并以两药低于 IC<sub>50</sub> 的浓度进行组合设立分组, 见表 1(其中药物浓度均为终浓度), 每组设 6 复孔, 作用 48 h 后各孔吸出培养液, PBS 洗 1 次, 吸弃 PBS 后进行以下各步实验。

### 1.3 分化抗原检测

“1.2”项下各孔细胞用预冷 PBS 洗涤弃上清, 残渣细胞收集至流式管分为二份, 一份加 CD34-FITC 和 CD117-PE 各 10 μL, 另一份加 CD14-FITC 和 CD11b-PE 各 10 μL, 避光放置 15 min 上机检测

表 1 各药物浓度组的设立(n=6)

Tab 1 Drug groups set up by concentration(n=6)

组别	DCA/μmol·L <sup>-1</sup>	VPA/mmol·L <sup>-1</sup>
对照组	0	0
DCA A 组	1.0	0
DCA B 组	4.0	0
VPA 组	0	2.0
联合用药 A 组	1.0	2.0
联合用药 B 组	4.0	2.0

各抗原的平均荧光强度(Mean Fluorescence Intensity, MFI)或阳性表达率。

## 1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件, 对各组中的分化抗原 MFI 和表达率做单因素方差分析和 LSD 两两检验, 以 P<0.05 为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CD34 和 CD117 MFI 检测

对照组、DCA A 组、DCA B 组、VPA 组、联合用药 A 组、联合用药 B 组的 CD117 MFI 分别为 95.34±4.61、90.68±2.34、76.35±3.1、86.34±3.5、75.24±2.9、70.11±2.6, 各药物组均低于对照组, 差异具有显著统计学意义(P<0.01), 联合用药 A、B 组均显著低于其各自的单药组(P<0.01)。对照组、DCA A 组、DCA B 组、VPA 组、联合用药 A 组、联合用药 B 组的 CD34 MFI 分别为 29.32±1.33、28.11±0.91、22.38±1.22、25.14±1.08、21.33±1.34、16.31±0.99, 各药物组除 DCA A 组以外均显著低于对照组(P<0.01), 联合用药 A、B 组均显著低于其各自的单药组(P<0.01)。结果见图 1。

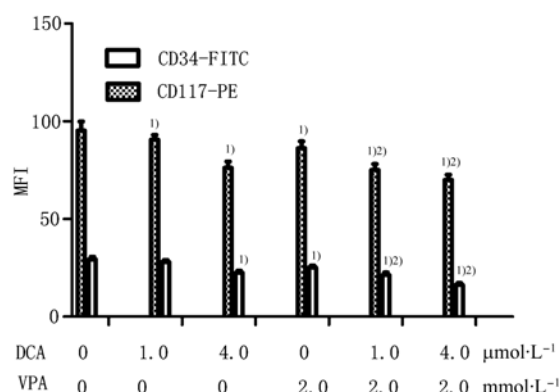


图 1 地西他滨联合丙戊酸钠对 HL-60 细胞 CD117 和 CD34 MFI 的影响(n=6)

与对照组比较, <sup>1)</sup>P<0.01; 与相应浓度单药组比较, <sup>2)</sup>P<0.01

Fig 1 Synergistic effect of DCA and VPA on CD117 and CD34 MFI of HL-60 cells(n=6)

Compared with normal group, <sup>1)</sup>P<0.01; compared with corresponding concentration single drug group, <sup>2)</sup>P<0.01

## 2.2 CD14 和 CD11b 表达率检测

对照组、DCA A 组、DCA B 组、VPA 组、联合用药 A 组、联合用药 B 组的 CD14 表达率分别为 (4.23±0.61)%、(10.62±1.52)%、(14.96±2.31)%、(6.12±0.81)%、(14.96±0.94)%、(16.39±1.68)%，各药物组均显著高于对照组( $P<0.01$ )，联合用药 A、B 组均显著高于其各自对应的单药组( $P<0.01$ )。CD11b 表达率分别为 (5.22±0.43)%、(13.22±1.11)%、(21.09±2.11)%、(8.13±1.14)%、(18.22±1.23)%、(24.11±2.01)%，各药物组均显著高于对照组( $P<0.01$ )，联合用药 A 组显著高于其各自对应的单药组( $P<0.01$ )。结果见图 2。

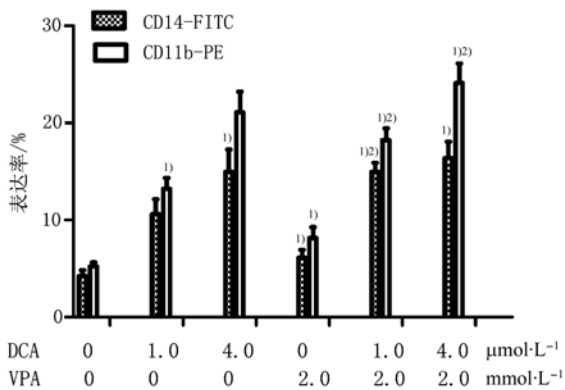


图2 地西他滨联合丙戊酸钠对 HL-60 细胞 CD14 和 CD11b 表达率的影响( $n=6$ )

与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与相应浓度单药组比较, <sup>2)</sup> $P<0.01$

Fig 2 Synergistic effect of DCA and VPA on CD14 and CD11b expression of HL-60 cells( $n=6$ )

Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with corresponding concentration single drug group, <sup>2)</sup> $P<0.01$

## 3 讨论

DCA 体内被磷酸化后, 抑制 DNA 甲基转移酶, 从而使 DNA 去甲基化, 激活抑癌基因发挥其抗肿瘤作用<sup>[7]</sup>, 但这种表观遗传学调控一般在  $\mu\text{mol}$  级发挥作用, 高浓度如  $\text{mmol}$  级反而会导致 DNA 损伤<sup>[8]</sup>, 而这种损伤和 p53 基因诱导表达 BH3 结构、凋亡蛋白 Puma 和 Noxa 及其 caspases 的激活有关。由于 DCA 治疗 AML 的疗效不理想, 临床和基础研究中对于 DCA 和其他药物联用增强抗 AML 效应进行了较多探索, 目前主要集中在和去乙酰化酶抑制剂的联用方面。去乙酰化酶抑制剂如丙戊酸钠作为另一种表观遗传学调控途径, 体内和 DCA 联用能增强 DCA 的疗效<sup>[9]</sup>, 而体外和 DCA 联用能增强其抗 AML 效应<sup>[10]</sup>。这说明表观遗传学调控中, 组蛋白去乙酰化和 DNA 甲基化

两种机制可以相互协调, 共同调控细胞活性。

AML 的治疗中, 对药物的评价不仅在于其诱导白血病细胞凋亡作用, 对白血病细胞的分化阶段的调节对于 AML 患者的血细胞功能恢复也具有重要的意义。CD34 表达于早期造血干/祖细胞, 是髓系早期细胞和 TdT+ 不成熟淋巴细胞的表面标记, CD117(c-kit 受体)是由 c-kit 原癌基因编码的 I 型跨膜糖蛋白受体, 主要表达于造血祖细胞, 大多数 AML 患者的原始细胞均有 CD117 的表达<sup>[11]</sup>, 并且 CD117 的高 MFI 和细胞的恶性程度相关, 往往预示着预后不良<sup>[12]</sup>。VPA 协同 DCA 降低 CD117 和 CD34 的 MFI 从分化抗原角度说明它们能共同作用于降低肿瘤细胞的恶性或原始程度。在临床应用中, DCA 主要的副作用为骨髓抑制导致血三系降低, 进而引起感染风险的增加, 一般需要口服抗生素加以预防。有报道, DCA 单药能促进 HL-60 的 CD14、CD11b 的表达<sup>[13]</sup>, 而 VPA 单药也能对 U937、K562 细胞株在形态学及抗原表达方面均有明显地诱导成熟分化倾向<sup>[14]</sup>。本研究显示  $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 VPA 等能增强 DCA 的促 HL-60 表达髓系成熟抗原 CD14 和 CD11b, 可能和两药联用后两种表观遗传学机制共同作用, 促进多种抑癌基因如 P14、P15 及 hPer3<sup>[13]</sup>等恢复, 进而作用于细胞分化有关。CD11b 主要表达于成熟单核、粒细胞, 常用来观察粒单系统的分化程度。CD14 为脂多糖(LPS)受体, 存在于单核细胞、巨噬细胞等细胞表面的白细胞分化抗原, 识别、结合 LPS, 介导 LPS 性细胞反应, 在 LPS 性炎症反应、内毒素休克等病理反应中起重要作用<sup>[15]</sup>。DCA 和 VPA 体外联用能促进 CD14 的表达, 提示其增强了体外抗革兰氏阴性菌能力, 但体内两药联用是否存在类似的效应, 尚需进一步研究。

## REFERENCES

- [1] LUBBERT M, SUCIU S, BAILA L, et al. Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome(MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(15): 1987-1996.
- [2] SANTOS F P, KANTARJIAN H, GARCIA-MANERO G, et al. Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2010, 10(1): 9-22.
- [3] CUI W, SUN J, COTTA C V, et al. Myelodysplastic syndrome with inv(3) (q21; q26.2) or t(3; 3)(q21; q26.2) has a high risk

- for progression to acute myeloid leukemia [J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136(2): 282-288.
- [4] BLUM W, KLISOVIC R B, HACKANSON B, et al. Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(25): 3884-3891.
- [5] MANEV H, UZ T. DNA hypomethylating agents 5-aza-2'-deoxycytidine and valproate increase neuronal 5-lipoxygenase mRNA [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 445(1/2): 149-150.
- [6] WHITMAN S P, HACKANSON B, LIYANARACHCHI S, et al. DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication [J]. *Blood*, 2008, 112(5): 2013-2016.
- [7] DASKALAKIS M, BLAGITKO-DORFS N, HACKANSON B. Decitabine [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2010, 184: 131-157.
- [8] BRODSKA B, OTEVRELOVA P, HOLOUBEK A. Decitabine-induced apoptosis is derived by Puma and Noxa induction in chronic myeloid leukemia cell line as well as in PBL and is potentiated by SAHA [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 350(1/2): 1-80.
- [9] CANDELARIA M, HERRERA A, LABARDINI J, et al. Hydralazine and magnesium valproate as epigenetic treatment for myelodysplastic syndrome. Preliminary results of a phase-II trial [J]. *Ann Hematol*, 2011, 90(4): 379-387.
- [10] YANG H, HOSHINO K, SANCHEZ-GONZALEZ B, et al. Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid [J]. *Leuk Res*, 2005, 29(7): 739-748.
- [11] MALAISE M, STEINBACH D, CORBACIOGLU S. Clinical implications of c-Kit mutations in acute myelogenous leukemia [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2009, 4(2): 77-82.
- [12] ADVANI A S, RODRIGUEZ C, JIN T, et al. Increased C-kit intensity is a poor prognostic factor for progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed AML [J]. *LeukRes*, 2008, 32(6): 913-918.
- [13] WANG Y K, ZHOU J H, ZHOU S Q, et al. Promoter methylation status of hPer3 gene in AML patients and the *in vitro* effect of decitabine on the status [J]. *Chin J Hematol(中华血液学杂志)*, 2011, 32(5): 317-321.
- [14] ZHAO S Q, LI J M, ZHOU L, et al. Valproate induces differentiation and apoptosis of myeloid leukemia cells and the related mechanisms [J]. *Shanghai Med J(上海医学)*, 2007, 30(11): 847-851.
- [15] DESSING M C, KNAPP S, FLORQUIN S, et al. CD14 facilitates invasive respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(6): 604-611.