

· 基础研究 ·

紫杉醇对 SHI-1 细胞株增殖抑制及凋亡的影响

张云宁¹, 石培民², 谢静²

(扬州大学附属泰兴医院: 1. 检验科; 2. 血液科, 江苏泰兴 225400)

摘要:目的 研究紫杉醇对人急性单核细胞白血病细胞株 SHI-1 细胞凋亡率和细胞周期的影响。方法 用不同浓度的紫杉醇作用于 SHI-1 细胞, 分别作用 0、12、24、36、48 h, 用细胞计数、台盼蓝染色观察细胞形态学改变、DNA 含量测定及异硫氰酸荧光黄(annexin-V-FITC)、碘化丙啶(PI)分析细胞凋亡、JC-1 染色检测细胞线粒体跨膜电位。结果 紫杉醇能抑制 SHI-1 细胞增殖活性, 呈现作用时间和剂量的量效关系, 出现典型的细胞形态的改变, 且随着药物浓度的增加和作用时间的延长, 抑制作用越明显; 紫杉醇对细胞凋亡率和细胞周期均有影响, AnnexinV/PI 荧光染色后细胞发生凋亡的特征性改变, 随药物浓度增加和作用时间的延长, 细胞凋亡率增加, G₂/M 期比例增高; 紫杉醇能使线粒体跨膜电位显著下降; 0.05 mg/L 处理组对 SHI-1 细胞株增殖抑制及诱导凋亡作用最为显著。结论 紫杉醇能抑制 SHI-1 细胞增殖活性, 诱导其凋亡, 使 SHI-1 细胞停留在 G₂/M 期。

关键词:紫杉醇; SHI-1 细胞株; 细胞周期; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.07.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)07-0781-02

Influence of taxol on SHI-1 cell proliferation inhibition and apoptosis

Zhang Yunming¹, Shi Peimin², Xie Jing²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Hematology, Affiliated Taixing Hospital, Yangzhou University, Taixing, Jiangsu 225400, China)

Abstract: Objective To observe the effects of taxol on apoptosis rate and cell cycle of novel human monocytic leukemia cell line SHI-1 cells in vitro. **Methods** SHI-1 cells were treated with different concentrations of taxol for 0, 12, 24, 36, 48 h. The cell counts, trypan blue staining, DNA content determination and Annexin-V/PI were used to analyze cell apoptosis and the JC-1 staining was used to detect the mitochondrial transmembrane potential. **Results** Taxol could inhibit the SHI-1 cells proliferation activity, showing the dose-effect relationship between the action time and dose. The typical cell morphology changes occurred, and the inhibition effect was more obvious with the drug concentration increase and the reaction time prolongation. Taxol affected the cell apoptosis rate and the cell cycle. The cells characteristic changes of apoptosis occurred after Annexin-V/PI staining. The apoptotic rate and the proportion of G₂/M phase were increased with the increase in drug concentration and the action time. Taxol could significantly decrease the mitochondrial transmembrane potential. The 0.05 mg/L treatment group had the most significant effect in inducing apoptosis and causing proliferation inhibition of SHI-1 cells. **Conclusion** Taxol can inhibit the SHI-1 cells proliferation activity, induce their apoptosis and make them remain in the G₂/M phase.

Key words: paclitaxel; SHI-1 cell line; cell cycle; apoptosis

近年来新技术、新的抑癌药物不断涌现, 但复发、难治性白血病的治疗, 仍然是个难题。紫杉醇作为一种新一代植物碱类抗肿瘤药物, 主要是通过作用于微管系统而抑制细胞分裂, 被广泛用于卵巢癌、乳腺癌、黑色素瘤、肺癌的治疗。现将本研究通过体外观察紫杉醇对人急性单核细胞白血病细胞株 SHI-1 的增殖抑制、诱导凋亡及诱导分化的作用报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 SHI-1 由苏州大学附属第一医院、江苏省血液研究所惠赠; 紫杉醇为江苏扬子江药业集团产品; IMDM 培养基为赛默飞世尔生物化学制品有限公司产品, 胎牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品; DNA 倍体分析试剂盒、异硫氰酸荧光黄(Annexin-V-FITC)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡试剂盒、JC-1(5', 6', 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide)细胞凋亡试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 SHI-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养液中, 置 37 ℃、饱和湿度、含 5% CO₂ 的恒温培养

箱内培养。2~3 d 更换培养液 1 次或根据培养液的颜色进行更换。取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 细胞活力和形态学观察 取对数生长期的细胞, 以 1×10^5 /mL 的细胞密度接种于 24 孔板中, 每孔 1 mL, 置 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。再分别加入不同浓度的紫杉醇, 使紫杉醇的终浓度分别为 5、0.5、0.05、0.005 mg/L 组, 同时设不加药物的空白对照组。每组设 3 个复孔。继续培养 12、24、36、48 h。用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤 2 次后, 用 0.4% 台盼蓝直接染色 2~10 min, 在显微镜下计数活细胞数。每次计数 3 次, 实验重复 3 次。细胞活率 = [活细胞数 / (活细胞 + 死细胞)] × 100%。取空白对照组和药物作用后的各组细胞先在倒置显微镜下观察, 再将细胞悬液离心涂片, 用瑞氏姬姆萨染色液染色, 光学显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.3 DNA 倍体分析 取各组经过药物处理后的细胞悬液检测 DNA 倍体。加入 20 μL PI 染液, 避光孵育 30 min 后, 上流式细胞仪检测, 分析后用 Modfit 软件进行 DNA 倍体分析, 计算出各期细胞的百分比。每组实验重复 3 次。

1.2.4 Annexin V/PI 标记染色测定凋亡细胞 取 24 孔板中的各组经过药物处理后的细胞悬液,采集 1×10^6 个细胞,用冷 PBS 液洗 1 遍后再 0°C 水浴,加入 $400\ \mu\text{L}$ 结合缓冲液后,轻轻混匀细胞后加入 $5\ \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 和 $5\ \mu\text{L}$ PI 液,避光孵育 15 min 后,用流式细胞仪检测。每组实验重复 3 次,绘制时效曲线。

1.2.5 JC-1 染色检测细胞线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$) 将 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液加入 JC-1 荧光染料 $5\ \mu\text{L}$ 充分混匀,置 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中,避光孵育 20 min,离心去除上清液并用 PBS 液洗涤 2 次,流式细胞仪检测,以 BD 公司 FACSDiva 软件分析结果。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 显微镜下观察紫杉醇诱导 SHI-1 细胞凋亡 倒置相差显微镜下,空白对照组 SHI-1 细胞呈梭形,形态均一,可成簇生长。较低浓度的紫杉醇药物组可观察到 SHI-1 细胞皱缩变小、胞体变圆,出现细胞碎片,未见细胞成簇生长。经瑞氏姬姆萨

染色油镜下观察,细胞形态出现核固缩、核边聚、核碎裂,胞膜出泡,并可见典型的凋亡小体等。

2.2 细胞活力测定 紫杉醇作用于 SHI-1 细胞后,随着作用剂量和时间的增加,细胞增殖率明显受到抑制,细胞活率也显著减少,呈现剂量和时间的量效关系(图 1)。

2.3 紫杉醇对 SHI-1 细胞凋亡的影响和对 SHI-1 线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)的影响 见表 1~2。紫杉醇对 SHI-1 细胞周期的影响见图 2。

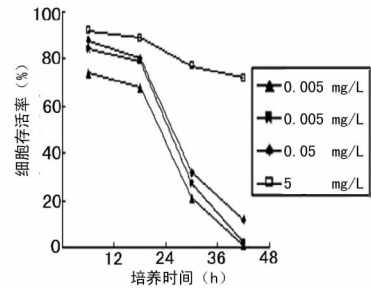
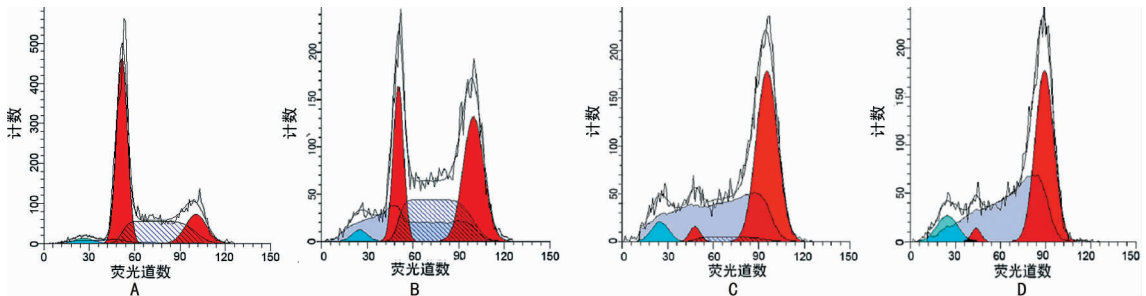


图 1 不同浓度紫杉醇作用 SHI-1 细胞存活率



A: 12 h; B: 24 h; C: 36 h; D: 48 h.

图 2 0.05 mg/L 浓度的紫杉醇对 SHI-1 细胞周期的影响

表 1 紫杉醇作用 12、24、36、48 h 后 SHI-1 细胞的凋亡率比较 ($n=3$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率			
	12 h	24 h	36 h	48 h
对照组	2.25±0.38	2.44±0.40	2.68±0.36	2.87±0.42
0.005 mg/L 组	2.77±0.45	2.89±0.49	3.04±0.44	3.99±0.40
0.05 mg/L 组	6.40±0.49*	18.51±0.87*	27.33±0.99*	33.72±1.12*
0.5 mg/L 组	6.70±0.54*	19.02±0.84*	28.04±1.02*	35.98±0.98*
5 mg/L 组	5.91±0.39*	13.44±0.75*	26.01±1.15*	27.20±1.22*

*: $P < 0.05$, 与对照组和 0.005 mg/L 组比较。

表 2 紫杉醇作用 SHI-1 细胞 $\Delta\Psi_m$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	降低细胞的比例 (%)			
	12 h	24 h	36 h	48 h
对照组	6.41±0.13	8.82±0.18	10.22±0.15	12.82±0.22
0.005 mg/L 组	8.92±0.24	13.84±0.36	14.83±0.34	18.50±0.45
0.05 mg/L 组	10.63±0.28*	25.50±0.24*	30.29±0.35*	60.13±0.43*
0.5 mg/L 组	12.51±0.44*	41.92±0.47*	49.25±0.40*	70.23±0.51*
5 mg/L 组	21.44±0.38*	60.51±0.55*	61.62±0.58*	78.05±0.48*

*: $P < 0.05$, 与对照组和 0.005 mg/L 组比较。

3 讨论

紫杉醇是一种广谱抗癌药,对普通抗癌药物耐药的某些晚期肿瘤有良好的疗效,对多种临床恶性肿瘤疗效显著。近年来,随着细胞凋亡研究的深入,人们已经认识到抗肿瘤药主要是通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥治疗作用,能否诱导凋亡以及凋亡的程度已成为评价抗肿瘤药物的重要指标^[1]。白血病的诱导分化和凋亡疗法逐步成为白血病的两个新治疗策略^[2]。有研究证实,紫杉醇抗肿瘤的机制之一是通过抑制细胞微管解聚,使细胞停滞在有丝分裂期,在 G_2/M 期中发挥凋亡诱导作用^[3]。此外,还具有提高宿主细胞免疫力和诱导肿瘤坏死的作用^[4]。本研究中 SHI-1 细胞株是由苏州大学附属第一医院、江苏省血液研究所建立,建自一例临床表现呈高度耐药的急性单核细胞白血病患者,被证实对多种化疗药物耐药^[5]。有研究表明,以 P 糖蛋白(P-gP)为代表的某些三磷酸腺苷结合蛋白超家族成员以及某些转运蛋白分子表达水平升高是很多化疗药物诱导肿瘤产生多药耐药的直接原因^[6-7]。虽然已有体外实验表明紫杉醇对白血病细胞株有增殖抑制作用^[8-9],但尚未有人研究其治疗难治性白血病的作用。

本研究结果表明,不同浓度的紫杉醇作用于 SHI-1 细胞株 12、24、36、48 h,细胞活力均有不同程度下降,以 48 h 更为明显。紫杉醇对细胞的生长具有明显的抑制作用,其中,0.005 mg/L 组对 SHI-1 细胞株增殖抑制作用较弱,随时间增加,其抑制率增大缓慢;0.05 mg/L 组对 SHI-1 细胞(下转第 810 页)

做到迅速准确测量 CVP,是一个急待解决的问题。目前,测定 CVP 的 3 种方法各有优缺点,使用一次性压力传感器检测 CVP 设备要求高,费用昂贵;传统方法测量中心静脉压过程繁琐,浪费人力物力;野战条件下多采用简易法测量 CVP^[2],但存在以下问题:(1)每次测量时需将输液瓶上的输液器拔下,测压时输液器上端直接暴露于空气中,违反无菌原则,增加污染机会;(2)测量时需 2 名护士,浪费人力,测量数值读取费时、不直观,野战条件下,测压执行困难。李子珠等^[3]设计将无菌液体空瓶用于 CVP 测量,在与大气相通时减少污染的机会,但是用物准备较多,过程繁琐,在野战条件下较难完成。郑晓兰等^[4]采用改良标尺测定 CVP,也取得了一定效果,但仍有未解决的问题。

基于以上因素的考虑,本研究设计此款便携式 CVP 测定装置。针头过滤器的使用使测压装置通过过滤器与大气相通,减少了污染的机会;透明自粘式标尺的应用,能直观快捷读取数据,1 人即可操作,节省了人力资源,并减少了不同标尺测量带来的误差。CVP 的测定受很多因素的影响^[5-9],为减少误差,本研究采取了标准化的 CVP 测定流程,并由 1 名有经验的护师专门进行测量,以减少由于体位、零点定位、胸膜腔内压、腹内压、冲管液体、中心静脉导管等因素导致的测量差异。作者体会到,该测压装置简便、省力、安全,1 人即能轻松操作,能及时准确为危重患者的急救提供重要的参考数据,能满足野战条件下的急救要求,也适宜基层医院和普通病房的使用。

(上接第 782 页)

株增殖抑制及诱导凋亡作用最为显著。本研究观察到药物浓度加大后,坏死细胞逐渐增多。因此,本研究认为,从凋亡的角度看诱导 SHI-1 细胞凋亡应选择适合的药物浓度和作用时间,这样可使正常细胞避免药物过大剂量和超长的作用时间带来的损害,任意提高药物浓度和延长作用时间对诱导细胞凋亡是无益的^[10]。

根据紫杉醇临床常规用药的剂量范围为 135~175 mg/m²,按文献^[11]推荐的公式计算,其在体内血浆中的浓度为 89~116 μg/mL,而本实验所采用的紫杉醇浓度远远低于该水平。本研究发现低浓度紫杉醇较高浓度更易诱导细胞凋亡,对紫杉醇临床治疗剂量的制定具有一定的参考价值。若在临床中使用紫杉醇治疗难治性白血病,可从小剂量开始,其临床疗效及不良反应有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1807(6): 735-745.
- [2] Lengfelder E, Saussele S, Weisser A, et al. Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, 56(2): 261-274.
- [3] El-Kareh AW, Labes RE, Secomb TW. Cell cycle checkpoint models for cellular pharmacology of paclitaxel and platinum drugs [J]. *AAPS J*, 2008, 10(1): 15-34.
- [4] 王海燕, 李运曼, 刘国卿. 紫杉醇抗癌机制研究进展 [J].

参考文献:

- [1] 曹伟新, 李乐之. 外科护理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 51.
- [2] 董娟, 陈平, 丁耀, 等. 床旁简易中心静脉压监测的方法和临床应用 [J]. *中国急救医学*, 2004, 24(11): 851-853.
- [3] 李子珠, 韩永菊. 液体空瓶在简易中心静脉测压中的应用 [J]. *护理学杂志*, 2008, 23(1): 6-8.
- [4] 郑晓兰, 范晓华. 一次性简易中心静脉压标尺的制作 [J]. *全科护理*, 2008, 6(31): 2836-2838.
- [5] 金小瑞, 高敏, 李晓芳, 等. 中心静脉压的监测与护理的研究进展 [J]. *当代护士*, 2010(8): 5-8.
- [6] 王汝雯, 赵淑银. 不同体位对连续中心静脉压监测的影响 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2011, 2(33): 191-193.
- [7] 卢小芹, 朱造兰. 中心静脉压测定的影响因素及其处理 [J]. *护理实践与研究*, 2009, 21(6): 97-99.
- [8] 吴邯, 王艳红. 三通管对测量中心静脉压的影响及对策 [J]. *护理实践与研究*, 2010, 4(7): 18-20.
- [9] 王秀华, 王学中, 贺洪亮. 床旁简易中心静脉压测定的影响因素及护理对策 [J]. *中国医药指南*, 2008, 10(6): 166-167.

(收稿日期: 2012-08-14 修回日期: 2012-10-16)

药学进展, 1999, 23(4): 209-214.

- [5] 陈苏宁, 薛永权, 张学光, 等. 一株伴有 t(6;11)(q27;q23) 和 P53 基因异常的人单核细胞白血病细胞系 SHI-1 的建立及鉴定 [J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(2): 94-99.
- [6] Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents [J]. *Pharmacol Ther*, 2000, 85(3): 217-229.
- [7] Parekh HK, Deng HB, Choudhary K, et al. Overexpression of sorcin; a calcium-binding protein, induces a low level of paclitaxel resistance in human ovarian and breast cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(6): 1149-1158.
- [8] 尤学芬, 陆德炎, 姚登福, 等. 紫杉醇诱导 HL-60 细胞凋亡的研究 [J]. *南通医学院学报*, 2001, 21(4): 351-352.
- [9] 赵小英, 徐磊, 张晓红, 等. 紫杉醇对 K562 细胞增殖抑制及诱导凋亡的作用 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2002, 17(6): 376-378.
- [10] 郭春龙, 朱晓敏, 曲世静, 等. 紫杉醇诱导人膀胱癌 EJ 细胞凋亡及与 Bcl-2 基因表达的关系 [J]. *实用癌症杂志*, 2011, 26(2): 124-127.
- [11] 达万明, 陆道培, 魏爱群, 等. 体外快速测定急性白血病细胞药物敏感性的初步报告 [J]. *中华内科杂志*, 1982, 21(2): 109-112.

(收稿日期: 2012-08-25 修回日期: 2012-10-16)