

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.23.005

G-CSF 增加三氧化二砷对骨髓增生异常综合征 细胞系 SKM-1 的细胞毒作用

雷美清, 罗贤生, 王智明[△], 孙令凤, 杨晓阳, 余 锋, 陈晓霞

(中南大学湘雅医学院附属海口市人民医院血液科 570208)

[摘要] **目的** 探讨粒细胞集落刺激因子(G-CSF)增强三氧化二砷(As_2O_3)诱导骨髓增生异常综合征(MDS)细胞株 SKM-1 细胞凋亡作用。**方法** 将不同浓度 G-CSF(10、20、40 ng/mL)与 SKM-1 细胞共育 48 h, 以不加 G-CSF 为空白对照组, 碘化丙锭细胞核染色法结合流式细胞术分析细胞周期变化。继之以 20 ng/mL G-CSF 预处理细胞 24 h, 不加 G-CSF 组为对照组, 然后将不同浓度的 As_2O_3 (2.5、5.0、10.0 μ mol/L) 加入实验组和对照组共培养 48 h, 分别采用 Cell Counting Kit(CCK-8) 检测细胞增殖和 Annexin V/PI 试剂盒结合流式细胞术检测细胞凋亡水平。**结果** 20 ng/mL G-CSF 为促进 SKM-1 细胞周期向 S 期转化的更好浓度 ($P < 0.05$); CCK-8 检测显示 $As_2O_3 + G-CSF$ 组较 As_2O_3 单药组抑制细胞生长更明显 ($P < 0.05$); 凋亡结果表明 $As_2O_3 + G-CSF$ 组细胞凋亡率高于 As_2O_3 组 ($P < 0.05$)。**结论** G-CSF 动员 SKM-1 细胞进入 S 期可能是其增强 As_2O_3 的诱导凋亡作用的机制之一。

[关键词] 粒细胞集落刺激因子; 三氧化二砷; 骨髓增生异常综合征; 细胞凋亡

[中图分类号] R551.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)23-3021-04

G-CSF enhances the cytotoxicity of arsenic trioxide against myelodysplastic syndromes cell line SKM-1

LEI Meiqing, LUO Xiansheng, WANG Zhiming[△], SUN Lingfeng,

YANG Xiaoyang, YU Feng, CHEN Xiaoxia

(Department of Hematology, Central South University Xiangya School of Medicine
Affiliated Haikou Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on arsenic trioxide (As_2O_3) induced apoptosis in myelodysplastic syndrome (MDS) cell line SKM-1. **Methods** Different concentrations of G-CSF (10, 20, 40 ng/mL) were co-cultured with SKM-1 cells for 48 h, with no G-CSF as the blank control group, flow cytometry was used to determined the cell cycle combined with propidium iodide staining. The cells were pretreated with 20 ng/mL G-CSF for 24 h, and no G-CSF as the control group. Then different concentrations of As_2O_3 (2.5, 5.0, 10.0 μ mol/L) were added to the experimental group and the control group for co-culture for 48 h, Cell Counting Kit (CCK-8) was used to detect cell proliferation and Annexin V/PI kit combined with flow cytometry were used to detect apoptosis. **Results** 20 ng/mL G-CSF was a better concentration to promote SKM-1 cell cycle to S phase ($P < 0.05$); CCK-8 assay showed that $As_2O_3 + G-CSF$ inhibited the cell growth more significantly than that of the As_2O_3 group ($P < 0.05$); apoptosis results showed that the apoptosis rate of the $As_2O_3 + G-CSF$ group was significantly higher than that of the As_2O_3 group ($P < 0.05$). **Conclusion** G-CSF can enhance As_2O_3 -induced apoptosis by mobilizing SKM-1 cells into S phase.

[Key words] granulocyte colony-stimulating factor; As_2O_3 ; myelodysplastic syndromes; apoptosis

骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS) 是一种异质性很强的造血干细胞水平的恶性肿瘤, 它属于髓系恶性肿瘤的一个分支^[1]。其临床特征有无效造血所致的血细胞减少, 高风险向急性白血病转化。MDS 发病率呈逐年上升趋势。由于绝大多数患者发病年龄较大, 因此传统化疗方案和异基因造血干细胞移植并非广泛适用^[2]。早期临床研

究报道了三氧化二砷 (As_2O_3) 可以明显改善 MDS 患者的血液学反应^[3], 鉴于单纯使用 As_2O_3 治疗的浓度偏高, 不良反应大, 易形成耐药性。一些以 As_2O_3 为基础的联合治疗用于 MDS 的尝试也在不断地探索中^[4-6]。事实上, 大多数化疗药主要杀灭处于增殖期白血病细胞。最近有文献报道重组人粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 动员休眠期的白血病干细胞进入细胞

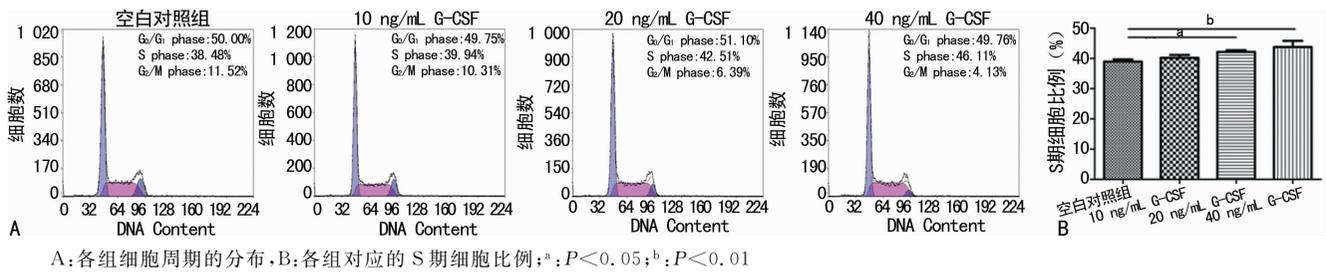


图 1 不同浓度 G-CSF 作用 48 h 对 SKM-1 细胞周期的影响

周期,从而增加它们对化疗药物的敏感性。事实上,As₂O₃ 皆有诱导肿瘤细胞进入周期和诱导肿瘤细胞凋亡的作用,但其具体作用机制未明^[7-8]。由此推测 G-CSF 联合 As₂O₃ 可能对 MDS 细胞有一定的协同效应。本研究以难治性贫血伴有原始细胞增多类型(MDS-RAEB)的细胞系 SKM-1 细胞为研究对象,比较 As₂O₃ 联合或不联合 G-CSF 对 SKM-1 细胞的抑制增殖和诱导凋亡作用及其可能的机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞株 SKM-1 属于 MDS-RAEB 型细胞株,由江苏省血液研究所保存。细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养,培养基在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度孵育箱内培养,每 2 至 3 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行药物干预实验。

1.2 药物和试剂 G-CSF(150 μg/支)购自齐鲁制药有限公司,用 PBS 配制成浓度为 10、20、40 ng/mL。注射用 As₂O₃ 购自北京双鹭药业股份有限公司,先用 PBS 配制药液浓度 5 × 10³ μmol/L(母液),使用前再稀释至所需 As₂O₃ 浓度(2.5、5.0、10.0 μmol/L)。RPMI 1640 培养液、胎牛血清购自 HyClone 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞周期分析 取对数生长期的 SKM-1 细胞,调整细胞密度至 2 × 10⁵/mL,置于 48 孔培养板(每孔 1 mL),分别加入不同浓度的 G-CSF(10、20、40 ng/mL)为预处理实验组,以不加 G-CSF 为空白对照组,作用 48 h 后收集细胞,PBS 洗涤 1 次后 70% 乙醇固定过夜。参考细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书处理细胞,用 FC500 流式细胞仪检测。采用 MultiCycle 软件分析细胞周期。实验重复 3 次。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率 取对数生长期的 SKM-1 细胞,调整细胞密度至 2 × 10⁵/mL 后接种于 96 孔培养板(每孔 90 μL),分为实验组、对照组、空白组,实验组采用 20 ng/mL G-CSF 预处理 24 h,以不加 G-CSF 为对照组,对照组和实验组分别加入不同浓度的 As₂O₃(2.5、5.0、10.0 μmol/L)10 μL,空白组(仅有 SKM-1 细胞)加等体积的 RPMI 1640 培养液,继续培养 48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱内培养 3 h,用酶标仪检

测 450 nm 波长处吸光度(A)值。每组设 3 个平行孔,实验重复 3 次,并按下列公式计算 As₂O₃ 对细胞增殖抑制率=(对照孔-实验孔)/(对照孔-空白孔) × 100%。

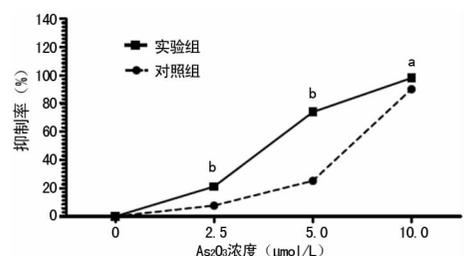
1.3.3 细胞凋亡的检测 细胞处理方法类似于细胞增殖实验,实验孔和对照孔在加入不同浓度 As₂O₃ 作用 48 h 后,用 PBS 洗涤 2 次,按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,进行流式细胞检测。总凋亡率=早期凋亡率(右下象限)+晚期凋亡率(右上象限)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对同一样本均数间比较采用单因素方差分析,两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞周期分析 不同浓度 G-CSF 分别作用于 SKM-1 细胞株 48 h,S 期细胞比例呈现随 G-CSF 浓度增加而升高的趋势;尽管 S 期比例在 10 ng/mL G-CSF 预处理实验组与空白对照组之间的差异无统计学意义,但是 20、40 ng/mL G-CSF 预处理实验组与空白对照组相比,S 期细胞比例差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见图 1。选择 20 ng/mL G-CSF 预处理作为联合 As₂O₃ 实验的基础。

2.2 不同浓度 As₂O₃ 和 G-CSF 联合对 SKM-1 细胞增殖抑制作用 采用 CCK-8 法测定不同浓度 As₂O₃ 作用 48 h 后 SKM-1 细胞增殖抑制率,结果显示 2.5、5.0、10.0 μmol/L As₂O₃ 实验组细胞增殖抑制率均显著高于对照组(*P* < 0.05),见图 2。



^a: *P* < 0.05; ^b: *P* < 0.01

图 2 各组组对 SKM-1 细胞增殖作用比较

2.3 G-CSF 联合不同浓度 As₂O₃ 对 SKM-1 细胞凋亡的影响 2.5、5.0、10.0 μmol/L As₂O₃ 对照组细

胞凋亡率分别为 3.22%、9.33%、39.22%，对应浓度的实验组细胞凋亡率分别为 17.67%、46.09%、65.51%；同一浓度 As₂O₃ 的实验组细胞凋亡率均显著高于对照组 ($P < 0.05$)，见图 3。

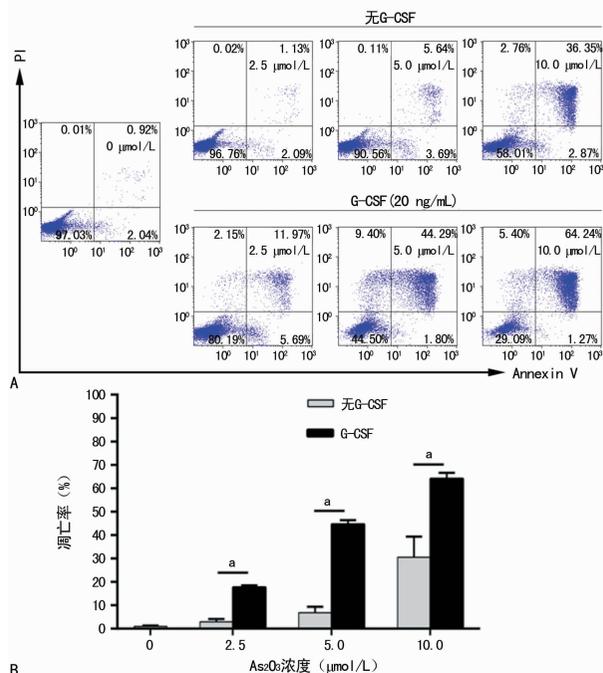


图 3 各组对 SKM-1 细胞凋亡作用的影响

3 讨论

MDS 的发病机制目前尚未被阐明，可能与分子遗传、造血微环境改变、造血干/祖细胞增殖和凋亡紊乱及抑癌基因甲基化等多因素有关^[9]。研究发现细胞凋亡及增殖的失调被认为是 MDS 发病机制中重要组成部分，到晚期则以异常克隆增殖为主，骨髓造血以高增殖低凋亡为主要表现^[10]。作为治疗急性早幼粒细胞白血病的经典药物 As₂O₃，低浓度 As₂O₃ (0.1~0.5 μmol/L) 只引起细胞分化，继续增加浓度则发挥诱导细胞凋亡作用^[11]。由于 As₂O₃ 在细胞内代谢时既消耗了甲基化所需的原料同时又降低了甲基化转移酶的数量和活性，有可能也发挥着去甲基化作用。因此，基于 As₂O₃ 单药或者 As₂O₃ 联合其他药用于 MDS 的治疗应运而生，有研究表明：G-CSF 可以增强低浓度 As₂O₃ 对 APL 细胞系的诱导分化作用^[12]。为进一步探讨 G-CSF 与 As₂O₃ 在 MDS 细胞株 SKM-1 中是否具有协同效应，因此本实验选择 2.5~10.0 μmol/L As₂O₃ 为作用于 SKM-1 细胞的药物浓度，从而为临床上治疗 MDS 提供新的思路和方法。

在细胞周期实验中，本研究采用 FCM 检测 G-CSF 作用 SKM-1 细胞后周期的变化，与对照组相比。结果显示，G-CSF 作用 48 h 显示 S 期细胞的比例明

显增高，并随着药物浓度的增加这种作用会越来越明显，对照组和实验组之间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。值得注意的是以往的文献报道 G-CSF 诱导白血病细胞 S 期比例增加时，G₀/G₁ 期比例减少^[13]，而本研究的结果提示 G-CSF 动员 S 期比例增多时，G₂/M 期比例减少，这可能与细胞株和作用时间不同等因素有关。而 G-CSF 与 As₂O₃ 两者联合作用的结果又将如何？与对照组相比，实验组对 SKM-1 的增殖抑制率和诱导凋亡率明显高于对照组，并呈浓度依赖性，同一浓度的实验组和对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。尽管 As₂O₃ 对肿瘤细胞有诱导分化和凋亡的双重作用。而本研究采用 As₂O₃ 属于高浓度范围，所以本实验的流式检测范围主要针对其对 SKM-1 的诱导凋亡作用，而未进行分化指标的相关检测。本研究的 As₂O₃ 单药诱导的凋亡作用类似于以往用 As₂O₃ 单药作用 SKM-1 的研究^[14]，并且，在同一浓度 As₂O₃ 作用下，联合 20 ng/mL 的 G-CSF 所产生的抑制增殖和诱导凋亡作用均较单独使用同浓度 As₂O₃ 明显增强 ($P < 0.05$)。由此推断，G-CSF 联合 As₂O₃ 可能是通过招募静息期的白血病细胞进入 S 期，从而增加 SKM-1 细胞对 As₂O₃ 治疗的敏感性。

临床上，G-CSF 或者 As₂O₃ 在 MDS 患者中的应用具有较好的耐受性。由于 MDS 疾病具有极大的异质性，包括 MDS 的不同分型白血病细胞表达 G-CSF 受体存在差异^[15]，因此，本实验的结果还需要在 MDS 的不同细胞株中进行验证。此外，临床上关于预激的时间不完全统一，在本实验中，尽管 G-CSF 对 SKM-1 细胞的 S 期转化的最佳时间是 48 h，考虑到后续 G-CSF 和 As₂O₃ 共同作用的时间还有 48 h，所以本实验选择 G-CSF 预激作用 24 h 的基础上加 As₂O₃ 继续作用 48 h，这样的序贯加药的时间与以往文献报道的预激方案相似^[16]。最后，本实验只涉及 As₂O₃ 联合 G-CSF 对 SKM-1 对增殖和凋亡的影响，其实 As₂O₃ 本身也影响白血病干细胞的细胞周期^[8]，而且相互作用的分子和信号通路尚不明确。所以关于 G-CSF 和 As₂O₃ 对 SKM-1 的协同作用还需要在体外实验和临床应用中进一步探讨^[17]。

综上所述，20 ng/mL 的 G-CSF 可以增强高浓度 As₂O₃ 对 MDS 细胞系 SKM-1 的诱导凋亡作用。机制可能与 G-CSF 转化细胞周期有关，提高白血病细胞对 As₂O₃ 抑制增殖和诱导凋亡的敏感性。当然，这还需要进一步研究加以证实。同时，这也是中药现代化的重要内容，具有重要的理论意义和潜在的临床应用价值。

参考文献

[1] ARBER D A, ORAZI A, HASSERJIAN R, et al. The

- 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. *Blood*, 2016, 127(20):2391-2405.
- [2] POURHASSAN H, DEFOR T, TROTTIER B, et al. MDS disease characteristics, not donor source, predict hematopoietic stem cell transplant outcomes [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2017, 52(4):532-538.
- [3] SCHILLER G J, SLACK J, HAINSWORTH J D, et al. Phase II multicenter study of arsenic trioxide in patients with myelodysplastic syndromes [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(16):2456-2464.
- [4] WEI W, ZHOU F, ZHANG Y, et al. A combination of thalidomide and arsenic trioxide is effective and well tolerated in patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Leuk Res*, 2012, 36(6):715-719.
- [5] WU P, LIU L, WENG J, et al. The synergistic effects of decitabine combined with arsenic trioxide (ATO) in the human myelodysplastic syndrome cell line SKM-1 [J]. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 2016, 32(4):412-417.
- [6] TAKAHASHI S. Combination therapy with arsenic trioxide for hematological malignancies [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2010, 10(6):504-510.
- [7] ESSERS M A, TRUMPP A. Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy [J]. *Mol Oncol*, 2010, 4(5):443-450.
- [8] TAKEISHI S, NAKAYAMA K I. To wake up cancer stem cells, or to let them sleep, that is the question [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(7):875-881.
- [9] OZCAN M A, ILHAN O, OZCEBE O I, et al. Review of therapeutic options and the management of patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Expert Rev Hematol*, 2013, 6(2):165-189.
- [10] RANKIN E B, NARLA A, PARK J K, et al. Biology of the bone marrow microenvironment and myelodysplastic syndromes [J]. *Mol Genet Metab*, 2015, 116(1/2):24-28.
- [11] CHEN G Q, SHI X G, TANG W, et al. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells [J]. *Blood*, 1997, 89(9):3345-3353.
- [12] IRIYAMA N, YUAN B, HATTA Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor potentiates differentiation induction by all-trans retinoic acid and arsenic trioxide and enhances arsenic uptake in the acute promyelocytic leukemia cell line HT93A [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(5):1875-1882.
- [13] BAI A, KOJIMA H, HORI M, et al. Priming with G-CSF effectively enhances low-dose Ara-C-induced in vivo apoptosis in myeloid leukemia cells [J]. *Exp Hematol*, 1999, 27(2):259-265.
- [14] 华海应, 高华强, 孙爱宁, 等. 三氧化二砷诱导骨髓增生异常综合征 SKM-1 细胞凋亡机制的研究 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(29):3897-3900.
- [15] XU H, LI A, YU Y, et al. Comparative analysis of G-CSFR and GM-CSFR expressions on CD34+ cells in patients with aplastic anemia and myelodysplastic syndrome [J]. *Int J Lab Hematol*, 2009, 31(6):597-602.
- [16] 薛胜利, 戴兰, 陈艳, 等. G-CSF 对急性淋巴细胞白血病细胞增殖活性的影响及协同化疗药物杀伤作用的实验研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(1):61-63.
- [17] FALCHI L, VERSTOVSEK S, RAVANDI-KASHANI F, et al. The evolution of arsenic in the treatment of acute promyelocytic leukemia and other myeloid neoplasms: Moving toward an effective oral, outpatient therapy [J]. *Cancer*, 2016, 122(8):1160-1168.

(收稿日期:2018-02-02 修回日期:2018-04-06)

(上接第 3020 页)

- [14] 连燕娜, 郭淑琴, 周绮云, 等. EGCG 对顺铂损伤 HEK293 细胞及杀伤 A549 细胞的影响 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2016, 28(1):14-18.
- [15] 杨伟, 胡相卡, 陈香, 等. EGCG 通过 HIF-1 α 信号通路对顺铂诱导大鼠肾损伤的保护作用 [J]. *中药药理学与临床*, 2016, 1(1):40-43.
- [16] LI Z P, YANG Z J, PASSANITI A, et al. A positive feedback loop involving EGFR/Akt/mTORC1 and IKK/NF- κ B regulates head and neck squamous cell carcinoma proliferation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22):31892-31906.
- [17] KIM K K, HAN A, YANO N, et al. Tetrathiomolybdate mediates cisplatin-induced p38 signaling and EGFR degradation and enhances response to cisplatin therapy in gynecologic cancers [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1):15911-15922.
- [18] LEDUC N, ATALLAH V, AGOSSOU M, et al. Lung adenocarcinoma survival in EGFR-Mutated African-Caribbean patients: a multicenter study in the French West Indies [J]. *Target Oncol*, 2017, 12(5):689-693.
- [19] 谭晓华, 张亚历, 周殿元. EGCG 诱导胃癌和肝癌细胞凋亡及 bcl-2 蛋白表达下调的研究 [J]. *癌症*, 2000, 19(7):638-641.
- [20] ZHENG Z, XIE D Y, SU H F, et al. Treatment outcome comparisons between exons 19 and 21 EGFR mutations for non-small-cell lung cancer patients with malignant pleural effusion after first-line and second-line tyrosine kinase inhibitors [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6):1010428317706211-1010428317706218.
- [21] 林晓贞, 梁钢, 黎莉, 等. EGCG 逆转人耐药肝癌细胞株多药耐药的体内实验研究 [J]. *广西医科大学学报*, 2006, 23(1):8-11.

(收稿日期:2018-02-27 修回日期:2018-04-11)