

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.06.008

· 基础研究 ·

## 小白菊内酯抑制 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 白血病细胞的增殖并增强其被 allo-NK 细胞杀伤的敏感性

曹东林, 李丽华, 林茂锐, 王婷, 胡亮杉(广东省第二人民医院 检验科, 广东 广州 510317)

**[摘要]** **目的:**探讨小白菊内酯(parthenolide, PTL)对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 白血病细胞的增殖、Bcl-2 表达及其被同种异体 NK(allo-NK)细胞杀伤敏感性的影响。**方法:**免疫磁珠法从 KG-1a 细胞中分离 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞。XTT 法检测 PTL 对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞增殖的影响, Real-time PCR 和 Western blotting 分别检测 PTL 对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达的影响, LDH 释放法观察 PTL 对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞被 allo-NK 细胞杀伤敏感性的影响。**结果:**PTL 对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞增殖的抑制呈剂量(2.5~80 μmol/L)依赖性。PTL 浓度为 2.5 μmol/L 时, PTL 组 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞的增殖抑制率显著高于对照组[(4.89±1.07)% vs 0, P<0.01]; PTL 杀伤 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 20 μmol/L; PTL 组 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞 Bcl-2 mRNA [(0.105±0.007) vs (0.307±0.013), P<0.01] 与蛋白表达均显著低于对照组。在效靶比为 10:1, 20:1 和 40:1 时, allo-NK 细胞对 PTL 组 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞杀伤率逐步升高, 且均高于阴性(无 PTL 处理)对照组[(19.76±1.01)%, (30.14±0.96)% 和 (51.48±3.15)% vs (12.50±1.42)%, (16.90±0.93)% 和 (31.70±1.53)% (均 P<0.01)]; 效靶比为 40:1 时, allo-NK 细胞对 PTL 组细胞的杀伤效率显著高于阳性(Bcl-2 抑制剂 ABT-737 处理)对照组[(51.48±3.15)% vs (43.08±2.81)%, P<0.05]。**结论:**PTL 能抑制 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞的增殖并增强其被 allo-NK 细胞杀伤的敏感性, 这可能与 PTL 下调 Bcl-2 的表达有关。

**[关键词]** 小白菊内酯; CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 白血病细胞; allo-NK 细胞; 杀伤; Bcl-2

**[中图分类号]** R733.7; R979.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)06-0679-06

## Parthenolide inhibits proliferation of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a leukemia cells and enhances susceptibility of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a leukemia cells to the cytotoxicity of allo-NK cells

Cao Donglin, Li Lihua, Lin Maorui, Wang Ting, Hu Liangshan (Department of Laboratory Medicine, Guangdong No. 2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of parthenolide (PTL) on the proliferation, bcl-2 expression and susceptibility of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a leukemia cells to cytotoxicity of allogeneic natural killer cells (allo-NK cells). **Methods:** CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a cells were separated from KG-1a cells by magnetic activated cell sorting (MACS). The effect of PTL on the proliferation of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a cells was assessed by XTT assay. The expression of Bcl-2 mRNA and protein in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a cells regulated by parthenolide were evaluated by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis (RT-PCR) and Western blotting, respectively. LDH-releasing assay was performed to observe the effect of PTL on the cytotoxicity of allo-NK cells against CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a cells. **Results:** PTL inhibited the proliferation of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a cells with a concentration-dependent manner. As the concentration of PTL was 2.5 μmol/L, the cellular proliferation inhibition rate of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a cells in PTL group was significantly higher than that of the control group [(4.89±1.07)% vs 0, P<0.01]. The IC<sub>50</sub> of PTL to inhibit the proliferation of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>

**[基金项目]** 广东省医学科研基金资助项目(No. A2012133), 广东省自然科学基金资助项目(No. S2012040007108)。Project supported by the Medical Research Foundation of Guangdong Province (No. A2012133), and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. S2012040007108)

**[作者简介]** 曹东林(1972-), 湖南资兴市人, 博士, 副教授, 主要从事血液肿瘤的基础与临床研究。E-mail: caodl@126.com

**[通信作者]** 胡亮杉(1980-), (Hu Liangshan, corresponding author), E-mail: liangshan8027@163.com

KG-1a leukemia cells was 20  $\mu\text{mol/L}$ . By treated with 20  $\mu\text{mol/L}$  PTL, the expression of *bcl-2* mRNA ( $[0.105 \pm 0.007]$  vs  $[0.307 \pm 0.013]$ ,  $P < 0.01$ ) and protein in  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  KG-1a cells were significantly lower than those of the control group. At effect-to-target ratio of 10:1, 20:1 and 40:1, the cytotoxicity rate of allo-NK cell against  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  KG-1a cells in the PTL group and in the positive control group was increasing and was higher than that of the negative control group ( $[19.76 \pm 1.01]\%$ ,  $[30.14 \pm 0.96]\%$  and  $[51.48 \pm 3.15]\%$  vs  $[12.50 \pm 1.42]\%$ ,  $[16.90 \pm 0.93]\%$  and  $[31.70 \pm 1.53]\%$ ; all  $P < 0.01$ ). In addition, at effect-to-target ratio of 40:1, the cytotoxicity rate of allo-NK cell against  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  KG-1a cells in the PTL group was significantly higher than that of the positive control group ( $[51.48 \pm 3.15]\%$  vs  $[43.08 \pm 2.81]\%$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** PTL can suppress the proliferation of  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  KG-1a cells and enhance its susceptibility to the cytotoxicity of allo-NK cells, which may be related with the down-regulation of *Bcl-2* by PTL.

**[ Key words ]** parthenolide;  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  KG-1a leukemia cells; allo-NK cells; cytotoxicity; *Bcl-2*

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(6): 679-684 ]

白血病是由于造血过程中某一阶段细胞克隆异常扩增而产生的造血系统恶性疾病,而白血病干细胞是白血病发生、发展和复发的根源<sup>[1]</sup>。研究发现,  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  白血病细胞具有白血病干细胞的特性<sup>[2]</sup>, 由于凋亡途径关键基因突变和凋亡信号系统功能缺失, 使白血病干细胞不仅对药物产生抵抗<sup>[3]</sup>, 对免疫系统的杀伤也产生抵抗<sup>[4]</sup>。allo-NK 细胞是同种异体反应性( allo-reaction )自然杀伤细胞, 是机体固有免疫系统的重要成分, 在移植物抗白血病效应中起关键作用<sup>[5]</sup>。NK 细胞能通过内外源性凋亡途径诱导细胞凋亡, 然而白血病干细胞高表达抗凋亡基因 B 淋巴细胞瘤-2 基因( B-cell lymphoma-2, *Bcl-2* )<sup>[6]</sup>, 从而逃避 allo-NK 细胞的杀伤。近来发现, 小白菊内酯( parthenolide, PTL )在不损伤正常骨髓细胞的情况下, 能够有针对性地作用于白血病干细胞凋亡途径的多个靶点<sup>[7]</sup>, 抑制白血病干细胞的活性, 改变白血病干细胞的生长周期, 抑制其自主生长<sup>[8]</sup>。PTL 能否调节 allo-NK 细胞对白血病干细胞的杀伤活性呢? 本研究以  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  KG-1a 白血病细胞为靶细胞, 观察 PTL 对 allo-NK 细胞杀伤  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  白血病干细胞样细胞的影响, 并对其作用机制进行初步探讨, 为治愈白血病提供新的思路和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和细胞培养

$\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  白血病细胞磁珠分选试剂和 NK 细胞分选试剂盒( Human NK Cell Isolation Kit )购自德国 Miltenyi 公司, XTT 细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天生物公司。CD34-PE、CD38-FITC、CD3-FITC 和 CD56-PE 单抗购自美国 BD 公司, RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自美

国 Hyclone 公司。引物由上海英俊公司合成, 逆转录试剂盒试剂和定量 PCR 试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司, BCA 蛋白检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司, 兔抗人 BCL-2 和 ACTIN 抗体及二抗均购自英国 Abcam 公司, Bcl-2 蛋白抑制剂 ABT-737 购自美国 Selleck 公司, LDH 释放杀伤检测试剂盒( Cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity assay )购自美国 Promega 公司。

人急性髓系白血病 KG-1a 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养, 当生长至 70% 汇合时按 1:3 传代, 取对数生长期细胞用于实验。

### 1.2 免疫磁珠法从 KG-1a 细胞中分离 $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ KG-1a 细胞

离心收集对数生长期的 KG-1a 细胞, 经 PBS 洗涤 2 次, 计数细胞, 以 PBS 重悬细胞至  $1 \times 10^8$  个/ml, 加入 FITC-CD38 抗体, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min。预冷 PBS 洗涤细胞 1 次, 倒去上清, 重悬细胞团, 每  $1 \times 10^7$  个细胞加入 90  $\mu\text{l}$  磷酸盐缓冲液和 10  $\mu\text{l}$  抗 FITC 的免疫磁珠, 混匀后置 40  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min。预冷 PBS 洗涤细胞一次, 弃上清, 重悬于 500  $\mu\text{l}$  分选液, 加到磁场 LD 柱中, 收集流出的未标记的  $\text{CD38}^-$  细胞并计数。分别取  $\text{CD38}^-$  KG-1a 细胞与未经分选的 KG-1a 细胞, 每  $1 \times 10^6$  个细胞加入 90  $\mu\text{l}$  磷酸盐缓冲液和 10  $\mu\text{l}$  CD34-PE 抗体, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测分选前后 KG-1a 细胞中  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  细胞的含量。

### 1.3 XTT 法检测 PTL 对 $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ KG-1a 细胞增殖的影响

细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{l}$ , 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后换液, 分别加入二甲基亚砜( DMSO )溶解的 0.25, 0.5, 1, 2, 4

和 8 mmol/L 的 PTL 各 1  $\mu$ l, 以 1  $\mu$ l DMSO 作为空白对照。培养 24 h 后, 每孔加入 50  $\mu$ l XTT 溶液, 继续培养 4 h, 振荡溶解, 用酶标仪测定 450 nm 处光密度 ( $D$ ) 值, 各组设 4 复孔, 取平均值。细胞增殖抑制率 (%) =  $(1 - D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

#### 1.4 Real-time PCR 检测 PTL 对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞 *Bcl-2* mRNA 表达的影响

取对数生长期 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞, 加 20  $\mu$ mol/L PTL 处理, 以 0  $\mu$ mol/L PTL 处理的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞作为对照。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后, 取两组细胞各 1  $\times 10^6$  个, PBS 洗涤 2 次, 加入 TRIzol 抽提细胞内总 RNA, 按照试剂盒说明书进行逆转录成 cDNA, Real-time PCR 检测细胞内 *Bcl-2* mRNA 的表达, 以  $\beta$ -actin 作为内参。*Bcl-2* 的上游引物为 5'-CTGGTGTACAACATCGC-3'、下游引物为 5'-GGAGAAATCAAACAGAGGC-3', 产物长度为 135 bp;  $\beta$ -actin 的上游引物为 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'、下游引物为 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3', 产物长度为 200 bp。按试剂盒说明书操作, 反应体系为上下引物 (10 pmol/L) 各 1  $\mu$ l、Mixture 10  $\mu$ l、cDNA 2  $\mu$ l、无菌双蒸水补足体系至 20  $\mu$ l。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。结束扩增后进入溶解曲线测定, 95  $^{\circ}$ C、1 min 使 DNA 双链打开, 再从 55  $^{\circ}$ C 以 2.2  $^{\circ}$ C/s 的速度上升至 95  $^{\circ}$ C, 共 40 个循环, 对扩增后 DNA 的纯度进行检测。结果采用相对定量的方法进行计算, 即以各模板  $\beta$ -actin 为内参, 通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  公式计算得到目的基因的扩增倍数。实验重复 3 次。

#### 1.5 Western blotting 检测 PTL 对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞 *Bcl-2* 表达的影响

取对数生长期 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞, 加 20  $\mu$ mol/L PTL 处理, 以 0  $\mu$ mol/L PTL 处理的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞作为对照组, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后, 600  $\times$  g、4  $^{\circ}$ C 离心 5 min, 收集对照组和实验组细胞, PBS 洗涤 1 次并计数。按照每 2  $\times 10^6$  个细胞加入 100  $\mu$ l 裂解液的比例加入细胞裂解液, 取少量样品用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 将其调整质量浓度为 2 mg/ml。SDS-PAGE 分离蛋白, 低温下湿转法转膜, 恒流 100 mA 过夜。将 NC 膜浸入封闭液中封闭 1 h, 依次加入 *Bcl-2* 抗体和 ACTIN 抗体室温孵育 1 h, 加入 HRP 标记的二抗, 室温下孵育 30 min, 洗涤二抗后, ECL 显色, 显影、定影, 观察结果。

#### 1.6 磁珠分选法分离健康人外周血 NK 细胞

分离 5 位健康志愿者外周血单个核细胞, 每

1  $\times 10^7$  个细胞加入 80  $\mu$ l 磷酸缓冲液和 20  $\mu$ l 抗 CD56 免疫磁珠抗体, 4  $^{\circ}$ C 标记 15 min 后洗涤, 用 500  $\mu$ l PBS 充分混匀后加入到磁柱中, 在 MACS 细胞分选仪中分离, 推注器将分选的阳性细胞推入无菌试管, 即为 NK 细胞。CD3-FITC 和 CD56-PE 单克隆抗体标记 NK 细胞, 流式细胞术检测 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK 细胞的含量。取 10  $\mu$ l 细胞悬液与等体积 0.4% 锥虫蓝混匀, 10 s 内于计数板上计数 200 个细胞, 锥虫蓝拒染的包膜完整的细胞所占比例即为 NK 细胞存活比例。

#### 1.7 LDH 释放法检测 PTL 对 allo-NK 细胞杀伤 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞的影响

取对数生长期 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞, 加 20  $\mu$ mol/L PTL 处理, 以 0  $\mu$ mol/L PTL 处理的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞作为阴性对照组, 以 30 nmol/L *Bcl-2* 蛋白抑制剂 ABT-737 作用后的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞为阳性对照组。三组细胞均置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后收集, 作为靶细胞; 以 allo-NK 细胞为效应细胞。按 LDH 释放杀伤检测试剂盒说明书操作, 按效靶比 5:1、10:1、20:1 和 40:1 铺板, 各组设 3 复孔, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养 4 h。在容积纠正组和靶细胞最大释放组中, 提前 45 min 加入裂解液 10  $\mu$ l/孔。1 760  $\times$  g 离心 5 min, 小心吸取每孔上清至另一 96 孔平底酶标板中, 加入 LDH 底物反应液 50  $\mu$ l/孔, 室温下避光放置 30 min 后加入终止液 50  $\mu$ l/孔终止反应。ELX-800 酶标仪测定波长 492 nm 处光密度 ( $D$ ) 值。allo-NK 细胞杀伤率 (%) =  $(D_{\text{实验孔}} - D_{\text{靶细胞自发释放孔}} - D_{\text{效应细胞自发释放孔}}) / (D_{\text{靶细胞最大释放孔}} - D_{\text{靶细胞自发释放孔}}) \times 100\%$ 。

#### 1.8 统计学处理

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS13.0 统计软件分析, 多组比较使用单因素方差分析法, 方差不齐时, 采用校正的  $F$  检验 Welch 法代替, 方差齐时组间多重比较采用 LSD 法, 方差不齐时组间多重比较采用 Dunnett's  $T3$  法。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 从 KG-1a 细胞株中分离出 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞

因 KG-1a 细胞均为 CD34<sup>+</sup>, 经免疫磁珠分选后, 收集到的细胞为 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞。流式细胞术检测磁珠分选前后的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞含量, 结果显示, 急性髓系白血病 KG-1a 细胞

中 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞量为( 43. 79 ± 3. 97 )%, 经磁珠分选后 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞量可达( 92. 31 ± 2. 35 )%( 图 1)。

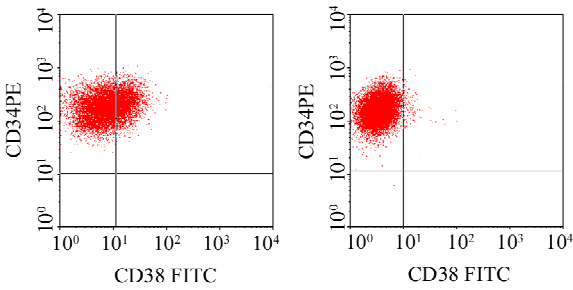


图 1 分选前后 KG-1a 细胞表面 CD34 和 CD38 的表达  
Fig. 1 Expression of CD34 and CD38 on the surface of KG-1a cells before and after MACS

2.2 PTL 抑制 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞的增殖

不同浓度 PTL 作用于 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞 24 h 后, 细胞生长受到不同程度的抑制。在 PTL 浓度为 2.5 μmol/L 时, PTL 组 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞的增殖抑制率显著高于对照组[ ( 4. 89 ± 1. 07 )% vs 0, P < 0. 01 ], 并随着 PTL 浓度的增大, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞的增殖抑制率呈剂量依赖性升高。PTL 杀伤 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 20 μmol/L( 图 2)。

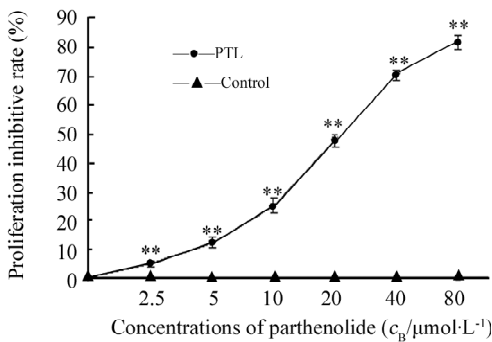


图 2 PTL 抑制 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞的增殖  
Fig. 2 PTL inhibited the proliferation of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a cells

\*\* P < 0. 01 vs control group

2.3 PTL 抑制 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达

Real-time PCR 检测结果显示, PTL 组 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞 Bcl-2 mRNA 扩增倍数显著低于对照组[ ( 0. 105 ± 0. 007 ) vs ( 0. 307 ± 0. 013 ), P <

0. 01 ]。Western blotting 检测 PTL 对 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞中 Bcl-2 表达的影响, 以 20 μmol/L PTL 处理细胞 24 h 后, PTL 组 Bcl-2 蛋白表达低于对照组( 图 3)。

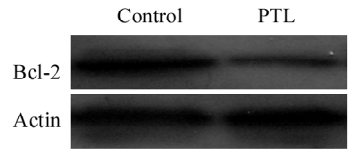


图 3 PTL 抑制 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞 Bcl-2 蛋白的表达  
Fig. 3 PTL inhibited the expression of Bcl-2 protein in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a cells

2.4 外周血中分离出高纯度、高活力的 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK 细胞

流式细胞术检测结果显示, 健康人外周血中 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK 细胞含量为( 8. 15 ± 1. 63 )%, 经磁珠分选后 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK 细胞含量达( 90. 03 ± 3. 43 )%( 图 4 ), 锥虫蓝染色检测细胞活力结果显示, CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK 细胞活力达( 97. 58 ± 1. 23 )%, 可直接用于后续实验。

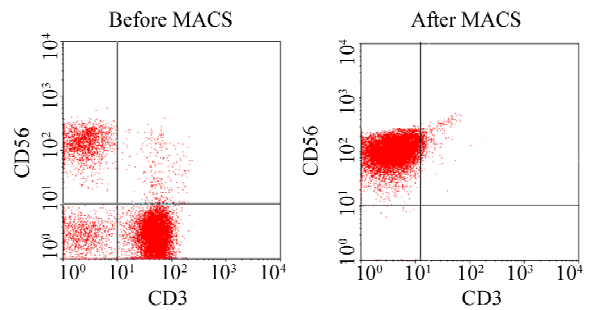


图 4 磁珠分选法从健康人外周血中分离获得 NK 细胞  
Fig. 4 NK cells isolated from healthy human peripheral blood by MACS

2.5 PTL 增强 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞对 allo-NK 细胞杀伤的敏感性

随着效靶比的增加, allo-NK 细胞对 PTL 组和阳性对照组 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞的杀伤活性随之增高。在效靶比为 10: 1, 20: 1 和 40: 1 时, allo-NK 细胞对 PTL 组 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> KG-1a 细胞的杀伤效率均高于阴性对照组[ ( 19. 76 ± 1. 01 )%, ( 30. 14 ± 0. 96 )% 和 ( 51. 48 ± 3. 15 )% vs ( 12. 50 ± 1. 42 )%, ( 16. 90 ± 0. 93 )% 和 ( 31. 70 ± 1. 53 )% ( 均 P < 0. 01 ) ]。并且, 在效靶比为 40: 1 时, allo-NK 细胞对

PTL 组 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞的杀伤效率显著高于阳性对照组[(51.48 ± 3.15)% vs (43.08 ± 2.81)% ,  $P < 0.05$ ](图 5)。

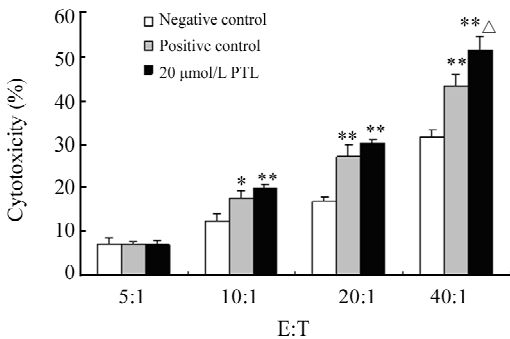


图 5 PTL 增强 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞对 allo-NK 细胞杀伤的敏感性

Fig. 5 PTL enhanced the susceptibility of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a cells to the cytotoxicity of allo-NK cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs negative control group;

Δ  $P < 0.05$  vs positive control group

### 3 讨论

白血病干细胞是急性髓系白血病耐药和复发的根源,也是急性髓系白血病治疗的难点和瓶颈。由于白血病干细胞的含量少,因此难以鉴定和分离<sup>[9]</sup>。一些已经建立的白血病细胞系,如红白血病 K562 细胞,可在培养基中维持,移植到体内可形成和原发病相似的肿瘤。因此,期望能够利用已建立的细胞株中存在的干细胞作为白血病干细胞的研究模型。人源性急性髓系白血病 KG-1a 细胞表达 CD34 而不表达 CD38,与公认的白血病干细胞表型 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>一致<sup>[10]</sup>。因此,本研究从已建立的白血病细胞株 KG-1a 细胞中分离 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞,作为白血病干细胞研究的靶细胞。

PTL 是植物药野甘菊的主要活性成分,属于倍半萜烯内酯化合物<sup>[11]</sup>。长期以来,PTL 一直作为传统的治疗偏头痛和炎症的药物。近来发现,PTL 可诱导胰腺癌、小细胞肺癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、多发性骨髓瘤等多种肿瘤细胞凋亡<sup>[12]</sup>,甚至能作用于肿瘤干细胞,但对正常细胞和正常干细胞均无杀伤作用<sup>[13]</sup>,提示 PTL 能通过调节多种肿瘤细胞,甚至肿瘤干细胞的凋亡通路。本研究的结果也显示,PTL 能有效抑制白血病 KG-1a CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>干细胞样细胞的增殖,且随着浓度的增大抑制作用更为明显。*Bcl-2* 基因是细胞凋亡研究中最受重视的癌基

因之一,能阻断内外源性凋亡通路<sup>[14]</sup>,使肿瘤细胞逃逸凋亡而长期生存。许多肿瘤细胞均高表达 *Bcl-2*<sup>[15-18]</sup>。本研究发现 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞的 *Bcl-2* 呈高表达,PTL 作用后的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞内 *Bcl-2* mRNA 和蛋白的表达明显降低,因此解除了 *Bcl-2* 对内外源性凋亡通路的阻滞,激活了 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞内外源凋亡通路的敏感性。

白血病干细胞凋亡通路的缺失是清除白血病干细胞最主要的障碍,使其对常规化疗药物抵抗,并且对 allo-NK 也抵抗<sup>[19]</sup>,具有很强的生存优势,不能被目前常规的临床治疗方法有效地清除。不论是常规的药物,还是免疫系统的监视,大部分均是通过诱导凋亡作用而清除恶变细胞。allo-NK 细胞能分泌穿孔素和颗粒酶通过内源性凋亡通路诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[20]</sup>;同时表达 TRAIL 和 FasL,与靶细胞表面死亡受体 DR4/5 和 Fas 结合,通过外源性凋亡途径诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[21]</sup>。因此,激活白血病干细胞的凋亡通路即可逆转白血病干细胞对 allo-NK 细胞杀伤的抵抗。本研究利用 *Bcl-2* 阻断剂 ABT-737 作用于 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞,能增强 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞被 allo-NK 细胞杀伤的敏感性,提示激活 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞凋亡通路的敏感性能增强被 allo-NK 细胞杀伤的敏感性。由此推测,PTL 能够通过降低白血病干细胞内 *Bcl-2* 的表达,从而增强 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>KG-1a 细胞被 allo-NK 细胞杀伤的敏感性。在效靶比为 40:1 时,allo-NK 细胞对 PTL 作用后的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞杀伤效应甚至比 *Bcl-2* 阻断剂 ABT-737 作用后的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞更高,提示 PTL 可能作用于 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞凋亡通路的多个靶点,从而使 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞对 allo-NK 细胞杀伤更为敏感。但有关其他机制的调节,还需进一步的研究。

综上所述,PTL 能抑制 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞的增殖,并且明显下调 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞 *Bcl-2* 的表达,并能增强 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>白血病细胞被 allo-NK 细胞杀伤的敏感性,这为 PTL 联合免疫治疗清除白血病干细胞提供了实验依据,为未来抗白血病治疗提供了新的思路和方法。

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Hoang VT, Zepeda-Moreno A, Ho AD. Identification of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia and their clinical relevance [ J ]. *Biotechnol J*, 2012, 7( 6 ): 779-788.
- [ 2 ] Langenkamp U, Siegler U, Jörger S, et al. Human acute myeloid leukemia CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> stem cells are susceptible to allorecognition

- tion and lysis by single KIR-expressing natural killer cells [ J ]. *Haematologica*, 2009, 94( 11 ): 1590-1594.
- [ 3 ] Al Baghdadi T, Abonour R, Boswell HS. Novel combination treatments targeting chronic myeloid leukemia stem cells [ J ]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2012, 12( 2 ): 94-105.
- [ 4 ] Hu L, Cao D, Li Y, et al. Resveratrol sensitized leukemia stem cell-like KG-1a cells to cytokine-induced killer cells-mediated cytotoxicity through NKG2D ligands and TRAIL receptors [ J ]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13( 7 ): 516-526.
- [ 5 ] Terszowski G, Passweg JR, Stern M. Natural killer cell immunity after transplantation [ J ]. *Swiss Med Wkly*, 2012, 142: w13700.
- [ 6 ] Funayama K, Murai F, Shimane M, et al. Adhesion-induced drug resistance in leukemia stem cells [ J ]. *Pharmacology*, 2010, 86( 2 ): 79-84.
- [ 7 ] Kim YR, Eom JI, Kim SJ, et al. Myeloperoxidase expression as a potential determinant of parthenolide-induced apoptosis in leukemia bulk and leukemia stem cells [ J ]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 335( 2 ): 389-400.
- [ 8 ] Guzman ML, Rossi RM, Neelakantan S, et al. An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells [ J ]. *Blood*, 2007, 110( 13 ): 4427-4435.
- [ 9 ] Buss EC, Ho AD. Leukemia stem cells [ J ]. *Int J Cancer*, 2011, 129( 10 ): 2328-2336.
- [ 10 ] Fuchs D, Daniel V, Sadeghi M, et al. Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394( 4 ): 1098-1104.
- [ 11 ] Mathema VB, Koh YS, Thakuri BC, et al. Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities [ J ]. *Inflammation*, 2012, 35( 2 ): 560-565.
- [ 12 ] Kreuger MR, Grootjans S, Biavatti MW, et al. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: Focus on parthenolide [ J ]. *Anticancer Drugs*, 2012, 23( 9 ): 883-896.
- [ 13 ] Liu Y, Lu WL, Guo J, et al. A potential target associated with both cancer and cancer stem cells: A combination therapy for eradication of breast cancer using vinorelbine stealthy liposomes plus parthenolide stealthy liposomes [ J ]. *J Control Release*, 2008, 129( 1 ): 18-25.
- [ 14 ] Davids MS, Letai A. Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer [ J ]. *J Clin Oncol*, 2012, 30( 25 ): 3127-3135.
- [ 15 ] Bodur C, Basaga H. Bcl-2 inhibitors: Emerging drugs in cancer therapy [ J ]. *Curr Med Chem*, 2012, 19( 12 ): 1804-1820.
- [ 16 ] Beurlet S, Omidvar N, Gorombe P, et al. BCL-2 inhibition with ABT-737 prolongs survival in an NRAS/BCL-2 mouse model of AML by targeting primitive LSK and progenitor cells [ J ]. *Blood*, 2013, 122( 16 ): 2864-2876.
- [ 17 ] Balakrishnan K, Gandhi V. Bcl-2 antagonists: A proof of concept for CLL therapy [ J ]. *Invest New Drugs*, 2013, 31( 5 ): 1384-1394.
- [ 18 ] Park HS, Hwang HJ, Kim GY, et al. Induction of apoptosis by fucoidan in human leukemia U937 cells through activation of p38 MAPK and modulation of Bcl-2 family [ J ]. *Mar Drugs*, 2013, 11( 7 ): 2347-2364.
- [ 19 ] She M, Niu X, Chen X, et al. Resistance of leukemic stem-like cells in AML cell line KG1a to natural killer cell-mediated cytotoxicity [ J ]. *Cancer Lett*, 2012, 318( 2 ): 173-179.
- [ 20 ] Cheng M, Zhang J, Jiang W, et al. Natural killer cell lines in tumor immunotherapy [ J ]. *Front Med*, 2012, 6( 1 ): 56-66.
- [ 21 ] Saito H, Takaya S, Osaki T, et al. Increased apoptosis and elevated Fas expression in circulating natural killer cells in gastric cancer patients [ J ]. *Gastric Cancer*, 2013, 16( 4 ): 473-479.
- [ 收稿日期 ] 2013-05-13 [ 修回日期 ] 2013-11-10  
[ 本文编辑 ] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1)生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2)各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3)限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam* HI、*Sal* I 等。(4)各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5)各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外),例如长度 *L* (*l*)、面积 *A* (或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。(6)化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*- 等。(7)数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8)英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。