

1,25 二羟基维生素 D₃ 对体外培养的 HL-60 细胞的作用

郑敏¹, 何云燕², 罗建明²

(1. 柳州市妇幼保健院, 广西 柳州 545001; 2. 广西医科大学第一附属医院, 广西 南宁 530021)

摘要: [目的] 研究 1,25 二羟基维生素 D₃ [1,25(OH)₂D₃] 对人 HL-60 细胞株生长、分化、凋亡及对维生素 D 受体(VDR)蛋白表达的影响。[方法] 在体外用不同浓度的 1,25(OH)₂D₃ 作用于对数生长期的 HL-60 细胞。甲基噻唑基四唑(MTT)比色法分析细胞增殖抑制作用, 硝基四氮唑蓝(NBT)还原实验法分析 HL-60 细胞的分化指标, 末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记染色法(TUNEL)检测细胞晚期凋亡的变化, 免疫细胞化学法检测 VDR 蛋白表达。[结果] 不同浓度的 1,25(OH)₂D₃ 作用后均可抑制 HL-60 细胞的生长, 呈剂量和时间依赖性; 可诱导 HL-60 细胞向成熟粒细胞分化并促其凋亡。1,25(OH)₂D₃ 作用前后 HL-60 细胞均表达 VDR 蛋白, 药物作用后 VDR 蛋白表达上调。[结论] 1,25(OH)₂D₃ 在一定浓度范围内可抑制 HL-60 细胞增殖, 诱导细胞分化及凋亡, 使 VDR 蛋白表达上调。

关键词: HL-60 细胞; 维生素 D 受体; 1,25 二羟基维生素 D₃

中图分类号: R34; R733 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)05-0409-04

The Effect of 1,25(OH)₂D₃ on HL-60 Cell Line

ZHENG Min¹, HE Yun-yan², LUO Jian-ming²

(1. Maternal and Child Health Hospital of Liuzhou City, Liuzhou 545001, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] at different concentrations on inhibition, differentiation, apoptosis and the expression of vitamin D receptor (VDR) protein in human leukemia cell line HL-60. [Methods] HL-60 cell line was treated by 1,25(OH)₂D₃ with different concentrations. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to evaluate the cell proliferation. The differentiation of HL-60 cells was detected by nitro blue tetrazolium (NBT) reduction test. The cells late apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling staining assay (TUNEL). The expression of VDR protein was detected by immunocytochemistry technique. [Results] 1,25(OH)₂D₃ with different concentrations could significantly inhibit the proliferation of HL-60 cells in a dose-dependent and time-dependent manner. 1,25 (OH)₂D₃ could remarkably induce HL-60 cells to differentiate towards mature granulocyte and enhance cell apoptosis rate. VDR protein expressed in the all HL-60 cell line before and after the action of 1,25 (OH)₂D₃. VDR protein expression up-regulated after drug action. [Conclusions] 1,25 (OH)₂D₃ at a certain concentration range can significantly inhibit the proliferation and induce differentiation and apoptosis in HL-60 cell line. 1,25 (OH)₂D₃ can increase expression of VDR protein in HL-60 cell line.

Key words: HL-60 cell; vitamin D receptor; 1,25(OH)₂D₃

除了经典的调节钙磷代谢外, 1,25 二羟基维生素 D₃ [1,25(OH)₂D₃] 及其类似物还具有抗增殖、促分化、促进肿瘤凋亡等作用。本文以人急性早幼粒细胞白血病细胞株 HL-60 为研究对象, 观察 1,25(OH)₂D₃ 作用前后细胞增殖、分化、凋亡及 VDR 蛋白表达的变化, 以探讨其对白血病细胞的作用机制。

收稿日期: 2012-08-13; 修回日期: 2013-01-08

通讯作者: 罗建明, E-mail: luojm06@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 试剂

HL-60 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究所以。1,25(OH)₂D₃ 购自 Sigma 公司。原位细胞凋亡检测试剂盒购自 Hoffmann-La Roche 公司。

1.2 细胞株复苏与培养

从 -80℃ 冰箱中取出 HL-60 细胞, 迅速于 37℃

融化,室温离心 1 000rpm×5min,去上清,用培养液洗涤后悬浮于 10% RPMI 1640 全培养液,于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,每 2~3d 换液及传代 1 次。

1.3 实验分组

本实验分为 3 组:①空白对照组(加入相应培养液);②乙醇对照组:加入乙醇使其终浓度为 0.1%,作为 1,25(OH)₂D₃ 对照;③VD 组:根据 1,25(OH)₂D₃ (简称 VD)浓度不同分为 4 个亚组,分别加入用 0.1% 乙醇溶解的 VD,加入相应培养液使其终浓度分别为 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L。每组设 3 个平行孔,全部实验均在相同的条件下重复 1 次。

1.4 台盼蓝拒染法计数活细胞

根据台盼蓝拒染法计数活细胞以调整细胞浓度。台盼蓝拒染率=(1-死细胞数/总细胞数)×100%。所有的实验细胞均取自对数生长期并且台盼蓝拒染率均在 95%以上。

1.5 MTT 法检测细胞增殖抑制

取 96 孔板,每孔接种细胞悬液 2×10⁴/ml,孵育 24~96h;每个时点终止前 4h,吸弃培养液,PBS 洗涤;加入 MTT(5g/L)20μl 培养 4h;离心弃上清,加入 150μl 二甲基亚砷,振荡至紫色结晶溶解;自动酶标仪测吸光度(A₅₇₀)值;计算生长抑制率(IR),IR=(1-实验组 A₅₇₀ 值/对照组 A₅₇₀ 值)×100%。每组设 3 个平行孔,实验在相同的条件下重复 1 次,取平均 IR 值为最终结果。

1.6 NBT 检测细胞分化

细胞孵育 72h,离心去上清,加 NBT 反应液 0.5ml,37℃培养 30min;离心,弃上清,涂片;光学显微镜下观察,胞浆内含有灰蓝颗粒的为阳性细胞。每张玻片随机取 10 个高倍视野(×40),镜下分别计数 NBT 阳性细胞,取平均值为最终结果,计算 NBT 阳性率。NBT 阳性率=(NBT 阳性细胞数/细胞总数)×100%。

1.7 TUNEL 法检测细胞凋亡

细胞孵育 72h。步骤参照试剂盒说明书:细胞涂片,室温干燥;4%多聚甲醛室温下固定 30min;PBS 浸泡 3 次,每次 3min;加 0.1%Triton X-100 冰上孵育 10min;0.3%H₂O₂ 室温孵育 15min;加入 TUNEL 反应物,37℃温盒孵育 1h;加入转换剂 POD,37℃ 30min;0.01mol/L PBS 浸泡 3min×3 次;AEC 染色 10min;苏木素染色 2min 至出现淡褐色背景;晾干;水性封片

剂封片;倒置显微镜下计数 200 个细胞,细胞内出现棕色/棕黄色颗粒者为凋亡细胞,取平均值为最终结果,计算凋亡指数。凋亡指数=(阳性细胞数/细胞总数)×100%。

1.8 免疫细胞化学法检测 VDR 蛋白表达

细胞孵育 72h。细胞涂片,4%多聚甲醛固定 10min,干燥后-20℃保存备检。采用超敏 S-P 免疫细胞化学法检测 VDR 蛋白的表达。细胞涂片解冻后用 PBS 液浸洗 5min×3 次;加入 50μl 过氧化物酶室温 10min;加入 50μl 正常非免疫动物血清室温 10min;加入 50μl Anti-VDR Ab,1:500,湿盒 4℃过夜;加入 50μl 生物素标记第二抗体室温 30min;加入 50μl 链霉菌抗生物素—过氧化物酶溶液室温 30min;加入二氨基联苯胺溶液,室温显色;自来水洗涤以中止显色;苏木素复染 360s;自来水冲洗返蓝;中性树脂封片;显微镜下观察结果并拍照。实验结果判断采用两人双盲法观察细胞涂片,每张玻片随机取 10 个高倍视野(×40),每个视野计数 100 个细胞,共计数 1 000 个细胞,计算 VDR 阳性细胞率。反应阳性为细胞核或细胞浆内有黄棕色至棕褐色颗粒并且明显高于背景染色。

1.9 统计学处理

计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。常规进行方差齐性检验、正态性检验。多组资料之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。由 SPSS13.0 for Windows 软件包自动完成。

2 结果

2.1 MTT 法检测细胞增殖抑制

MTT 染色后倒置显微镜下可见活细胞有针芒状结晶,而凋亡细胞和坏死细胞无结晶;凋亡细胞的细胞质浓缩,核浓缩且偏向一侧;坏死细胞变得松散(Figure 1)。VD 对 HL-60 细胞的抑制率呈时间、剂量依赖性,即随时间的延长或 VD 浓度的增加对细胞的抑制作用增加(Table 1)。乙醇对照组与空白对照组相比,IR 变化不明显($P > 0.05$),显示使用乙醇作为溶剂对细胞增殖的影响不明显。

2.2 1,25(OH)₂D₃ 对细胞分化、凋亡和 VDR 表达的影响

经单因素方差分析,1,25 (OH)₂D₃ 对 HL-60 细胞分化和凋亡的影响均呈剂量依赖性。1,25(OH)₂D₃ 作用前后细胞均有 VDR 表达(Figure 1)。单因素方差分析显示且 VDR 的表达随浓度的增高而增高 ($F=111.045, P<0.01$)(Table 2)。

Table 1 The effect of 1,25(OH)₂D₃ to HL-60 cell proliferation($\bar{x}\pm s, n=6$)

Groups	24h	48h	72h	96h
Blank control	0.80±0.07	0.98±0.08	0.98±0.10	1.27±0.11
Ethanol control	0.81±0.07	1.01±0.09	0.96±0.09	1.29±0.13
10 ⁻⁹ mol/L VD	2.38±0.15*	8.05±0.26* [△]	15.96±0.61* [△]	20.86±1.67* [△]
10 ⁻⁸ mol/L VD	4.06±0.92*	19.11±1.31* [△]	33.19±1.24* [△]	37.05±1.81* [△]
10 ⁻⁷ mol/L VD	6.11±1.14*	25.15±1.19* [△]	38.84±2.45* [△]	42.10±2.22* [△]
10 ⁻⁶ mol/L VD	9.20±1.04*	34.17±2.15* [△]	41.14±2.29* [△]	42.75±3.46*

Note:compared to blank control in the same time, * $P<0.05$;compared to the ahead time in the same group, [△] $P<0.05$

3 讨论

近 30 年来儿童急性白血病(AL),尤其是急性淋巴细胞白血病长期无事件生存率已经达到 80%以上^[1,2]。目前 AL 的治疗主要采用大剂量联合化疗,药物不良反应大,部分患者反应不佳,甚至产生耐药性^[3]。因此需要寻找新型、特异性高、不良反应小的

抗白血病药物。已经有大量的研究发现 1,25(OH)₂D₃ 对体外培养的多种肿瘤细胞均有抑制增殖及促进凋亡的作用,并能抑制体内多种肿瘤,如乳腺癌、肝癌、皮肤癌等^[4]。文献报道 VD 对人神经母细胞瘤、肠癌、乳腺癌细胞等实体瘤均有诱导分化的作用^[5]。Garay 等^[6]报道

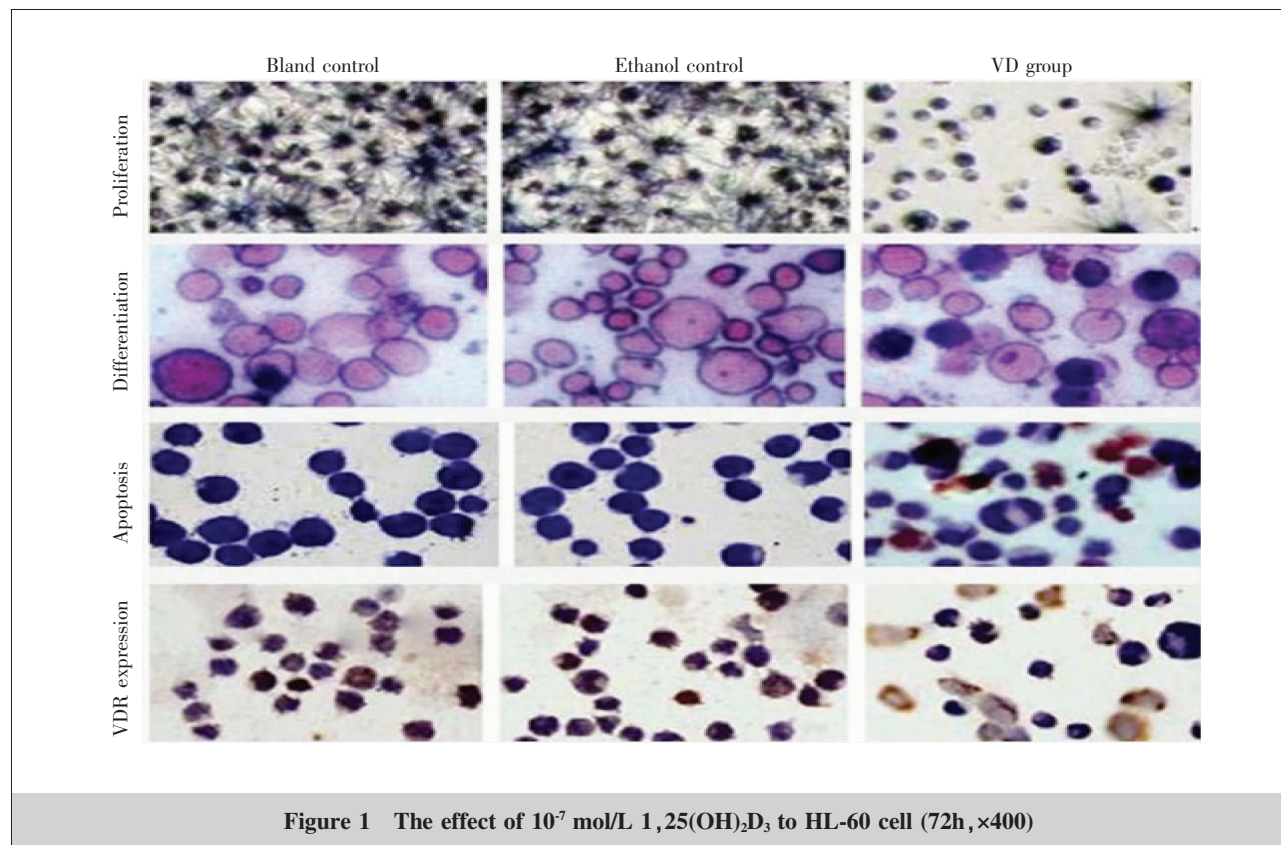


Table 2 The effect of 1,25(OH)₂D₃ to HL-60 cell differentiation,apoptosis and VDR expression ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Groups	Blank control	Ethanol control	10 ⁻⁹ mol/L VD	10 ⁻⁸ mol/L VD	10 ⁻⁷ mol/L VD	10 ⁻⁶ mol/L VD	F	P
NBT positive rate(%)	1.23±0.07	1.25±0.06	9.32±0.39* [△]	23.07±3.38* [△]	32.7±3.14* [△]	53.01±2.94* [△]	497.290	<0.01
Apoptotic index(%)	1.47±0.07	1.58±0.05	14.88±0.94*	32.80±3.07* [△]	37.80±2.72* [△]	39.63±2.73*	736.698	<0.01
VDR expression	25.3±1.72	26.43±1.50	31.69±2.07*	39.35±2.36* [△]	47.82±2.64* [△]	48.67±3.56*	111.045	<0.01

Note:compared to blank control, * $P<0.05$;compared to the ahead group, [△] $P<0.05$

VD 可以使人类白血病细胞系 HL-60 细胞向成熟单核/巨噬细胞分化。NBT 还原试验是从功能及生物化学变化方面来反映早幼粒细胞分化的常用指标。正常中性粒细胞由于细胞内的磷酸戊糖旁路途径活跃,在佛波酯的激发下,使过氧化物产生增加,将可溶性的 NBT 还原成不可溶的蓝色甲臞颗粒,沉积在细胞浆里,这些细胞浆里含蓝色颗粒的细胞称为阳性细胞,表示白血病细胞已经分化。本实验 NBT 还原实验中在倒置显微镜下可见悬浮细胞逐渐贴壁生长,显示原始粒细胞逐渐向成熟粒细胞分化。油镜观察发现在 VD 作用下,HL-60 细胞趋向体积缩小,核质比例降低,核缩小,核仁减少甚至消失,核染色质由疏松趋向致密,核形态扭曲折叠或分叶,胞质趋向成熟表现等。这表明在诱导分化剂量下,VD 可通过诱导 HL-60 细胞向成熟粒细胞分化,这可能是 VD 抗白血病作用的机制之一。MTT 结果显示,VD 对 HL-60 细胞有生长抑制作用,在 10^{-9} ~ 10^{-6} mol/L 浓度范围内作用 0~96h,药物浓度越高、作用时间越长则生长抑制率越高,有量效—时效关系。目前认为 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 主要通过 VDR 介导其诱导的细胞凋亡效应,VDR 是诱导凋亡所必需的受体,VDR 的水平与 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的生物学作用呈正相关^[8],调节细胞核内 VDR 蛋白表达成为调节细胞对 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 反应性的重要途径之一^[9]。多项研究表明, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对许多组织细胞 VDR 蛋白具有上调作用^[10,11]。我们的实验发现,VD 处理后 HL-60 细胞 VDR 蛋白表达上调。TUNEL 法实际上是形态学与分子生物学相结合的研究方法,对完整的单个凋亡细胞或者凋亡小体进行原位染色,能够检测出微量的凋亡细胞,因而在细胞凋亡研究中被广泛采用。本实验用 TUNEL 法检测发现经 VD 处理 72h 后 HL-60 细胞的凋亡率均明显上升,提示 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导凋亡可能是其抗肿瘤作用机制之一。目前临床上常用的抗肿瘤药物多数以诱导细胞凋亡的方式杀死肿瘤细胞,但毒性大,而 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 是体内激素,不良反应相对较小,这也提示了用 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 治疗白血病的可能性和可行性。但是,从结果可见,单用 10^{-7} mol/L VD 处理 HL-60 细胞 72h,增殖抑制率分别仅为 38.84%,凋亡率也仅为 37.80%,并且加大 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 浓度或延长作用时间,增殖抑制率和凋亡率也无明显上升,因此有必要联用其他抗肿瘤药物,增加疗效;也

需要继续探讨凋亡的其他信号途径,更全面地认识 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 抗白血病的作用机制,为 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 应用于临床治疗提供坚实的理论依据;并且维生素 D 治疗白血病还缺乏体内和临床研究依据,这有待于今后的进一步研究。

参考文献:

- [1] Mitchell C,Richards S,Harrison CJ,et al. Long-term follow-up of the United Kingdom medical research council protocols for childhood acute lymphoblastic 1980–2001[J]. *Leukemia*,2010,24(2): 406–418.
- [2] Silverman LB,Stevenson KE,O'Brien JE,et al. Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985–2000) [J]. *Leukemia*,2010,24(2):320–334.
- [3] Park SH,Chi HS,Park SJ,et al. Clinical importance of morphological multilineage dysplasia in acute myeloid leukemia with myelodysplasia related changes[J]. *Korean J Lab Med*,2010,30(3):231–238.
- [4] Asgari MM,Tang J,Warton ME,et al. Association of pre-diagnostic serum vitamin D levels with the development of basal cell carcinoma[J]. *J Invest Dermatol*,2010,130(5): 1438–1443.
- [5] Ray R,Lambert JR. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃-3 β -bromoacetate,a potential cancer therapeutic agent: synthesis and molecular mechanism of action [J]. *Bioorg Med Chem Lett*,2011,21(8):2537–2540.
- [6] Garay E,Donnelly R,Wang X,et al. Resistance to $1,25\text{D}$ -induced differentiation in human acute myeloid leukemia HL60-40AF cells is associated with reduced transcriptional activity and nuclear localization of the vitamin D receptor [J]. *J Cell Physiol*,2007,213(3):816–825.
- [7] Heikkinen S,Väisänen S,Pehkonen P,et al. Nuclear hormone $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin D₃ elicits a genome-wide shift in the locations of VDR chromatin occupancy [J]. *Nucleic Acids Res*,2011,39(21):9181–9193.
- [8] Lisse TS,Hewison M,Adams JS. Hormone response element binding proteins: novel regulators of vitamin D and estrogen signaling[J]. *Steroids*,2011,76 (4): 331–339.
- [9] Sundar IK,Hwang JW,Wu S,et al. Deletion of vitamin D receptor leads to premature emphysema/COPD by increased matrix metalloproteinases and lymphoid aggregates formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2011,406(1):127–133.
- [10] So JY,Lee HJ,Smolarek AK,et al. A novel Gemini vitamin D analog represses the expression of a stem cell marker CD44 in breast cancer[J]. *Mol Pharmacol*,2011,79(3):360–367.