

达沙替尼联合氟达拉滨 对慢粒 K562 细胞的抑制作用研究*

苗玉迪^a, 魏绪仓^b (陕西省人民医院 a. 血液内科; b. 血液病研究室, 西安 710068)

摘要:目的 探讨达沙替尼联合氟达拉滨对慢粒 K562 细胞的抑制作用。方法 选取慢粒 K562 细胞株进行研究, 采用 MTT 法分别测定单独使用达沙替尼和氟达拉滨对慢粒 K562 细胞的抑制率, 以及达沙替尼联合氟达拉滨对诱导 K562 细胞的抑制率。根据金氏方程计算 2 种药物联合的抑制率及凋亡情况的协同作用及治疗效果。金氏公式为: $q = D1 + 2 / (D1 + D2 - D1 \times D2)$, q 表示 2 种药物联合的抑制率, $D1$ 和 $D2$ 是单独用药作用的抑制率。当 q 值 > 1.15 表示为协同作用。经过不同浓度的达沙替尼 (1, 5, 10 $\mu\text{g/L}$) 和氟达拉滨 (1, 2.5, 5 ng/L) 单独处理后或联合处理 (1 $\mu\text{g/L}$ 达沙替尼 + 1 ng/L 氟达拉滨), (5 $\mu\text{g/L}$ 达沙替尼 + 2.5 ng/L 氟达拉滨), (10 $\mu\text{g/L}$ 达沙替尼 + 5 ng/L 氟达拉滨) 24 h 后, K562 细胞的增殖受到明显的抑制, 且达沙替尼和氟达拉滨具有协同效应。结果 在相同的时间范围内, 氟达拉滨和达沙替尼对 K562 细胞的抑制作用呈剂量依赖性, 由于 5 $\mu\text{g/L}$ 达沙替尼和 2.5 ng/L 氟达拉滨均能明显抑制 K562 细胞的增殖作用, 因此在后续的实验过程中, 选择该浓度作为细胞处理的终浓度。实验组和对照组的抑制率, 差异均有统计学意义 ($t = 39.998, P < 0.05$)。达沙替尼联合氟达拉滨存在协同抑制慢粒 K562 细胞的作用 ($q > 1.15, P < 0.05$); 低浓度 (1 $\mu\text{g/L}$) 达沙替尼对慢粒 K562 细胞 p-BCR/ABL 水平的下调作用 ($31.8\% \pm 1.9\%$) 明显优于高浓度 (10 ng/L) 氟达拉滨 ($15.2\% \pm 2.1\%$), 联合药物更明显下调慢粒 K562 细胞 p-BCR/ABL 水平的表达 ($49.8\% \pm 1.1\%$), 差异具有统计学意义 ($t = 6.754, P < 0.05$)。达沙替尼联合氟达拉滨能改善白血病, 提高凋亡细胞的数量。结论 达沙替尼联合氟达拉滨作用于白血病慢粒 K562 细胞具有协同抑制作用, 加速慢粒 K562 细胞的凋亡, 具有重要的临床意义。

关键词: 达沙替尼; 氟达拉滨; 白血病; 慢粒 K562 细胞; 抑制作用

中图分类号: R557.3; R446.113 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)05-070-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.05.021

Study on Inhibition of Dasatinib and Fludarabine to CML K562 Cells

MIAO Yu-di^a, WEI Xu-cang^b (a. the Blood Internal Medicine;

b. Department of Blood Disease, Shaanxi Province People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** To study the inhibition of Dasatinib and fludarabine on CML K562 cells. **Methods** CML K562 cells were analyzed, the MTT method was used to determine the inhibition of CML K562 cells, dasatinib and fludarabine, respectively, and the inhibition rate of dasatinib joint fludarabine to CML K562 cells. According to kim formula, calculated the synergistic effect and the therapeutic effect of the inhibition rate and apoptosis of 2 kinds of drug combinations [Kim formula: $q = D1 + 2 / (D1 + D2 - D1 \times D2)$]. q means the inhibition rate of two drug combination, $D1$ and $D2$ inhibition rate of the medicine effect. When the q value is greater than 1.15 was expressed as synergy, according to the guinness book of equation proved the inhibition rate and apoptosis of synergy and the treatment effect of two drug combination. Determined by MTT method to detect the results showed that after different concentrations for Dasatinib (1, 5, 10 $\mu\text{g/L}$) and fluorine (1, 2.5, 5 ng/L) after treatment alone or combined processing (1 $\mu\text{g/L}$ Dasatinib + 1 ng/L fludarabine), (5 $\mu\text{g/L}$ Dasatinib + 2.5 ng/L fludarabine), (10 $\mu\text{g/L}$ Dasatinib + 5 ng/L fludarabine) after 24 h, inhibition of the proliferation of K562 cells were obvious, and Dasatinib and fluorine had a synergistic effect. **Results** At the same time within the scope of fluorine dara marina and for sand for inhibition of K562 cells was dose dependent, because mu 5 g/L for sand for shore and 2.5 ng/L fluorine dara could significantly inhibits the proliferation of K562 cells, so in subsequent experiments, chose the concentration as the final concentration cell processing. The inhibition rate of the experimental group and control group, all had statistical significance ($t = 39.998, P < 0.05$). For sand for joint fluorine dara marina exist K562 cells of synergistic inhibition CML ($q > 1.15, P < 0.05$); Low concentrationmu (1 g/L) for sand for K562 cells of CML p-lower BCR/ABL level role ($31.8\% \pm 1.9\%$) high concentration (10 ng/L) was obviously better than the fluorine dara marina ($15.2\% \pm 2.1\%$), combination of drugs more apparent K562 cells by CML p-the expression of BCR/ABL levels ($49.8\% \pm 1.1\%$), statistically significant difference ($t = 6.754, P < 0.05$). For sand for joint fluorine dara marina can improve leukemia, increase the number of apoptotic cells. **Conclusion** Dasatinib and fludarabine effect on CML K562 cellshave synergistic inhibition effect, accelerate the apoptosis of CML K562 cells, has important clinical significance.

Keywords: dasatinib; fludarabine; leukemia; CML K562 cells; inhibition

* 作者简介: 苗玉迪 (1975-), 女, 硕士在读, 主治医师。

慢性粒细胞白血病是一种发生在早期多能造血干细胞水平上的恶性骨髓增殖性疾病。随着伊马替尼治疗时间的延长,原发或继发耐药导致的治疗失败越来越多见,已严重制约了其临床应用。如何解决耐药性的问题,是当前研究关注的焦点。笔者曾探讨过氟达拉滨联合格列卫诱导 K562 细胞耐药性^[1],国内还有其他作者采用索拉非尼联合柔红霉素^[2],Hsa-miR-203 联合伊马替尼^[3],伊马替尼联合 P27 基因克隆^[4]等多种方法,均对慢粒 K562 细胞具有一定的抑制作用,而且对诱导的 K562 细胞的蛋白具有一定的协同抑制作用,能有效治疗白血病。达沙替尼是一个 Abl 与 Src 家族双向激酶抑制剂,对 Abl/Src 激酶有高度选择性,对 bcr/abl 融合基因阳性细胞株的抑制作用比伊马替尼强 100~300 倍,降低 bcr/abl 磷酸化活性的作用比伊马替尼强 1 000 倍。氟达拉滨是阿糖腺苷的氟化核苷酸衍生物,可以明显的治疗 B-细胞慢性淋巴细胞白血病,抑制癌细胞的生长。目前对达沙替尼联合氟达拉滨对 K562 细胞的抑制作用的研究比较少,本实验着手这方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料 试剂:达沙替尼,氟达拉滨,伊马替尼试剂均采购于 sigma 公司。兔抗 p-BCR/ABL 单克隆抗体购自 sigma 公司。人髓系白血病细胞株慢粒 K562 细胞由实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 慢粒 K562 细胞培养^[2]:慢粒 K562 细胞在 37℃,5 ml/dl CO₂ 条件下培养,培养液为 10% 的灭活新生牛血清(10.0 g/dl)的 RPMI-1640 培养基,再加入 1×10⁵ U/L 的青霉素和 100 mg/L 的链霉素进行培养。收集生长 1~3 天的对数生长期细胞进行试验。

1.2.2 MTT 法检测^[3]:将生长的 K562 细胞接种于无菌的孔板中,将不同浓度达沙替尼作用于 K562 细胞,24 h 后加入 MTT,培养 4 h,加入 100 μg/L DMSO 溶解结晶,酶标仪测定 490 nm 吸光值,通过公式计算得到达沙替尼对 K562 的抑制率。单独的氟达拉滨的步骤和达沙替尼基本一致。2 种药物的联合作用于 K562 细胞,计算 2 种药物联合的抑制率。细胞增殖抑制率(%)=(对照组-实验组)/对照组×100%。

1.2.3 金氏方程计算 2 种药物联合的抑制率^[5]:金氏公式为: $q=D1+2/(D1+D2-D1 \times D2)$, q 表示 2 种药物联合作用的抑制率,D1 和 D2 是单独用药作用的抑制率。当 q 值>1.15 表示为协同作用,<0.85 表示拮抗作用,而在 0.85~1.15 之间表示相加作用。

1.2.4 Western blotting 检测 K562 细胞的蛋白 p-BCR/ABL:具体操作参照陈琰等^[6]人 Western blotting 检测 K562 细胞的蛋白 p-BCR/ABL 的具体操作步骤。对比分析低浓度(1 μg/L)达沙替尼和高浓度(10 ng/L)氟达拉滨或联合用药对 K562 细胞的蛋白 p-BCR/ABL 的调节作用。

1.3 统计学分析 数据分析使用 SPSS20.0 统计学软件,计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量数据进行 t 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的达沙替尼、氟达拉滨和达沙替尼联合氟达拉滨的抑制率比较 具体见表 1。

表 1 不同浓度达沙替尼,氟达拉滨和达沙替尼联合氟达拉滨的抑制率比较($\bar{x} \pm s$)

分组	浓度	抑制率(%)	t 值	P
对照	—	0.12±0.09	—	—
氟达拉滨(ng/L)	1	6.80±0.36	11.721	<0.05
	2.5	8.32±1.12	14.909	<0.05
	5.0	9.18±1.01	15.112	<0.05
达沙替尼(μg/L)	1	18.9±1.2	22.913	<0.05
	5	21.9±1.6	25.158	<0.05
	10	25.8±1.1	29.317	<0.05
达沙替尼联合氟达拉滨	1+1	37.5±1.5	35.027	<0.05
	2.5+5.0	45.8±2.1	39.998	<0.05
	5+10	49.7±1.9	43.896	<0.05

2.2 达沙替尼、氟达拉滨和达沙替尼联合氟达拉滨对慢粒 K562 细胞蛋白 p-BCR/ABL 的下调作用

通过试验结果可知,采用 1 μg/L 的达沙替尼、10 ng/L 氟达拉滨和联合药物处理 K562 细胞 24 h 后,高浓度(10 ng/L)氟达拉滨对慢粒 K562 细胞蛋白 p-BCR/ABL 的下调作用(15.2%±2.1%)明显低于低浓度(1 ng/L)达沙替尼(31.8%±1.9%)和达沙替尼联合氟达拉滨(1 μg/L+10 ng/L)(49.8%±1.1%),差异具有统计学意义($t=6.574, P<0.05$)和($t=6.113, P<0.05$),2 种药物联合作用对慢粒 K562 细胞蛋白 p-BCR/ABL 的下调明显。具体见图 1。

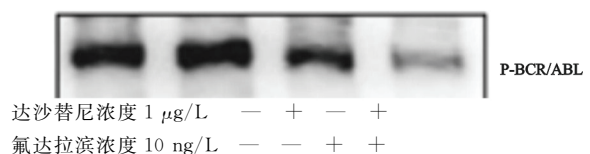


图 1 K562 细胞的蛋白 p-BCR/ABL

3 讨论 慢性粒细胞白血病患者 95% 以上患者遗传学特征:t(9;22)(q34;q11),形成 bcr/abl 融合基因,由于其编码的 p210bcr/abl 蛋白具有高酪氨酸激酶的活性,可导致自身酪氨酸残基磷酸化及许多重要的底物蛋白磷酸化,使细胞恶性转化,过度增殖和凋亡受阻。目前认为,bcr/abl 基因突变是甲磺酸伊马替尼产生耐药的常见机制,已检测到的

突变有 100 多种。bcr/abl 基因突变引起 ABL 激酶氨基酸改变,通过直接阻断伊马替尼与 ABL 激酶的结合或者妨碍 ABL 激酶失活构象的形成而干扰药物与靶位点的结合,最终导致耐药的发生。达沙替尼是一种多酪氨酸激酶抑制剂,可以抑制 BCR-ABL 激酶和 SRC 家族激酶的表达。可以治疗伊马替尼耐药或不能耐受的慢性粒细胞白血病。氟达拉滨是阿糖腺苷的氟化核苷酸衍生物,可以明显的治疗 B-细胞慢性淋巴细胞白血病,抑制癌细胞的生长。

K562 细胞中存在多种蛋白的表达,p-BCR/ABL 是 K562 细胞中常见的蛋白,BCR-ABL 融合基因也是慢性粒细胞白血病发病的分子基础。不同的药物联合对 p-BCR/ABL 蛋白具有显著的影响,如杜圣红等^[5]人研究伊马替尼联合槲皮素可以有有效的下调 p-BCR/ABL 蛋白的表达。肖若芝等^[8]人研究了索拉非尼联合柔红霉素对 K562 细胞株协同作用,发现索拉非尼联合柔红霉素对 K562 细胞具有明显的抑制协同作用,因此采用索拉非尼联合柔红霉素可以起到抑制耐药性的 K562 细胞的生长,增加细胞的凋亡。黄之虎等^[8]人研究了三氧化二砷联合 miR-203 对人白血病 K562 细胞的抑制作用,发现 miR-203 可提高白血病 K562 细胞对三氧化二砷的敏感性,从而抑制 K562 细胞的生长,加速细胞的凋亡和下调相应蛋白水平的表达。大量的研究^[9~12]采用不同药物可一定程度上起到抑制 K562 细胞的生长,加速细胞凋亡和下调蛋白的表达,抑制肿瘤细胞的生长,加速肿瘤细胞的凋亡。

本研究对比分析达沙替尼、氟达拉滨及达沙替尼联合氟达拉滨对抑制 K562 细胞的生长,加速细胞的凋亡,下调 p-BCR/ABL 蛋白的表达。达沙替尼可以抑制 p-BCR/ABL 蛋白的表达,低浓度(0.1 nmol/L)的达沙替尼对 K562 细胞的 p-BCR/ABL 蛋白的下调作用明显优于高浓度(10 nmol/L)的氟达拉滨,而且联合用药对 K562 细胞的 p-BCR/ABL 蛋白的下调作用更明显。提示两药联合可协同降低 BCR/ABL 蛋白的磷酸化水平^[13]。可以达到对 K562 细胞的抑制,加速细胞的凋亡,下调 p-BCR/ABL 蛋白的表达的作用。

综上所述,达沙替尼联合氟达拉滨对 K562 细胞具有协同抑制作用,加速 K562 细胞的凋亡,下调 p-BCR/ABL 蛋白的表达,具有重要的临床意义。

参考文献:

[1] 苗玉迪,焦红侠,王 晖,等. 氟达拉滨联合格列卫诱导 k562 细胞耐药性的研究[J]. 现代检验医学杂志,

2012,27(5):11-14.

Miao YD, Jiao HX, Wang H, et al. Impact of K562 cells, resistance induced by the Fludarabine joint STI571[J]. J Mod Lab Med, 2012, 27(5): 11-14.

[2] 肖若芝,何程明,王立琳,等. 索拉非尼联合柔红霉素对白血病 K562 细胞的抑制作用[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 26(7): 1356-1361.

Xiao RZ, He CM, Wang LL, et al. Combination of sorafenib and daunorubicin has antileukemic activity on K562 cells[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2013, 26(7): 1356-1361.

[3] 谢杏仪,黎毓光,韩泽平,等. Hsa-miR-203 联合伊马替尼对慢性粒细胞白血病 K562 细胞的作用[J]. 安徽医药, 2013, 17(10): 1764-1766.

Xie XY, Li YG, Han ZP, et al. Effect of imatinib combined with Hsa-miR-203 gene on chronic myeloid leukemia cells line K562[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2013, 17(10): 1764-1766.

[4] 王 玮,孙秉中,谢 红,等. 伊马替尼联合 P27 基因克隆对慢性粒细胞白血病 K562 细胞的作用[J]. 实用医学杂志, 2013, 22(13): 1473-1476.

Wang W, Sun BZ, Xie H, et al. Effect of imatinib combined with P27 gene clone on chronic myeloid leukemia cells line K562[J]. Journal of Practical Medicine, 2013, 22(13): 1473-1476.

[5] 杜圣红,何 丛,贾培敏,等. 伊马替尼联合槲皮素对 K562 细胞增殖、凋亡的影响及其机制研究[J]. 诊断学理论与实践, 2013, 12(6): 610-614.

Du SH, He C, Jia PM, et al. Effect of combined use of imatinib and quercetin on proliferation and apoptosis of K562 cell line[J]. J Diagn Concepts Pract, 2013, 12(6): 610-614.

[6] 陈 琰,肖若芝,王立琳,等. U0126 增强索拉非尼对 K562 细胞增殖抑制、凋亡及诱导分化作用[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(5): 859-864.

Chen Y, Xiao RZ, Wang LL, et al. U0126 enhance sorafenib-induced proliferation inhibition, apoptosis and differentiation in K562 cell[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2011, 27(5): 859-864.

[7] 王 彦,冯文莉. 伊马替尼治疗慢性粒细胞白血病的耐药机制与对策[J]. 生命的化学, 2013, 33(4): 407-412.

Wang Y, Feng WL. Mechanism and strategy against Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia [J]. Chemistry of Life, 2013, 33(4): 407-412.

[8] 肖若芝,王立琳,阮星星,等. 索拉非尼联合柔红霉素对 K562 细胞株协同作用的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(3): 621-624.

Xiao RZ, Wang LL, Ruan XX, et al. Effect of sorafenib combined with daunorubicin on K562 cell line [J]. Journal of Experimental Hematology, 2010, 18(3): 621-624.

[9] 黄之虎,韦思羽,农朝赞,等. 三氧化二砷联合 miR-203 对人白血病 K562 细胞的抑制作用及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(5): 499-454.

Huang ZH, Wei SY, Nong CZ, et al. Inhibiting effects of arsenic trioxide in combination with miR-203 on leukemic K562 cells and its mechanisms[J]. Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 499-454.

[10] 孙 晶,赵艳红,周 晋. 达沙替尼治疗核心结合因子相关性急性髓系白血病的理论基础及最新临床研究[J]. 中国新药杂志, (下转 75 页)

(上接 72 页)2015,24(9):1013-1016.

Sun J, Zhao YH, Zhou J. Basic theory the therapy CBF-AML with dasatinib and the advance in clinical study[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2015, 24 (9):1013-1016.

- [11] 王 杨,于 森.石蒜碱诱导人白血病 K562 细胞凋亡的研究[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2015,31(2):135-139,169.

Wang Y, Yu M. Study on lycorine-induced apoptosis of human K562 cells[J]. Journal of Harbin University of Commerce(Natural Science Edition), 2015, 31(2):135-139,169.

- [12] 丁亦含,樊晓东,吴晶晶,等. Survivin 抑制剂 YM155 对 K562 细胞凋亡和自噬的影响[J]. 中国实验血液

学杂志,2015,23(2):375-380.

Ding YH, Fan XD, Wu JJ, et al. Effect of YM155 on apoptosis and autophagy of K562 cells[J]. Journal of Experimental Hematology, 2015, 23(2):375-380.

- [13] 邱 林,王晓丹,于波海,等. 新型酪氨酸激酶抑制剂 HHGV 678 对 Bcr-Ab 野生型细胞株和伊马替尼耐药细胞株抑制作用的体外研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(5):1039-1043.

Qiu L, Wang XD, Yu BH, et al. Effect of a novel tyrosine kinase inhibitor HHGV678 on growth inhibition of Bcr-Ab wild type and IM-resistant cell lines in vitro[J]. Journal of Experimental Hematology, 2008, 16(5):1039-1043.

收稿日期:2015-08-02

修回日期:2015-08-06