

地西他滨联合丙戊酸钠体外诱导 1 例 AML-M₂ 复发患者原始细胞凋亡分化的作用研究

陈琼娜 王晔恺 周吉航 李翊卫 曾 芳 刘晓光

摘 要 **目的** 探讨地西他滨(decitabine,DCA)和丙戊酸钠(valproic acid,VPA)联用对 1 例复发性 AML-M₂ 患者原始细胞体外的影响。**方法** 分选此例患者骨髓原始细胞,设立药物分组如下:对照组,DCA 单药 A 组(1.0 μ mol/L),DCA 单药 B 组(4.0 μ mol/L),VPA 单药组(2.0mmol/L),联合用药 A 组(DCA 1.0 μ mol/L + VPA 2.0mmol/L),联合用药 B 组(DCA 4.0 μ mol/L + VPA 2.0mmol/L),作用 48h。应用流式细胞术检测早期凋亡率和 CD117、CD14 表达率。**结果** 相对于各自的单药组,联合用药 A 组和联合用药 B 组均能显著提高早期凋亡率和 CD14 表达,抑制 CD117 的表达($P < 0.01$)。**结论** 体外 DCA 联合 VPA 能显著加强抗白血病效应。

关键词 急性粒细胞白血病 丙戊酸钠 地西他滨 分化抗原 117 分化抗原 14

Synergistic Effect of Decitabine and Valproic Acid on Differentiation and Apoptosis of Stem Cells of an AML-M₂ Patient in vitro. Chen Qiongna, Wang Yekai, Zhou Jihang, Li Yiwei, Zeng Fang, Liu Xiaoguang. Zhoushan Hospital, Zhejiang 316004, China

Abstract Objective To investigate the synergistic effect of decitabine(DCA) and valproic acid(VPA) on differentiation and apoptosis of stem cells of an AML-M₂ patient *in vitro*. **Methods** The stem cells in the bone marrow of the AML-M₂ patient were sorted by flow cytometry. The groups were set as follows: control group; DCA alone group A(1.0 μ mol/L); DCA alone group B(4.0 μ mol/L); VPA alone group(2.0mmol/L); combination group A(DCA 1.0 μ mol/L + VPA 2.0mmol/L); combination group B(DCA 4.0 μ mol/L + VPA 2.0mmol/L). The cells were treated by drug for 48 hours. Then the apoptosis rates, CD117 and CD14 expressions were detected by flow cytometry. **Results** Compared with corresponding concentration single drug group, the apoptosis rates and CD14 expressions of the combination group A and B were significantly higher($P < 0.01$) and CD117 expressions of the combination group A and B were significantly lower($P < 0.01$). **Conclusion** There was an enhanced antileukemia activity of combinations of DCA and VPA.

Key words AML-M₂; Valproic acid; Decitabine; CD117; CD14

地西他滨(decitabine,DCA)主要成分为 5-杂氮-2'-脱氧胞苷,为一种去甲基化药物,目前获批用于中高危骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome,MDS)的治疗。在先前的研究中,我们发现体外 AML 细胞株中利用 DCA 可引起其生长抑制、促其凋亡和分化^[1]。在国外临床试验中,DCA 联合某些组蛋白去乙酰化酶抑制剂药物如丙戊酸钠(valproic acid,VPA)对难治/复发性 AML 患者往往能收到较好的疗效^[2]。由于国内 DCA 尚未正式获批用于 AML 的治疗,因此我们通过分选一例难治/复发性的 AML-M₂ 患者的原始细胞,体外观察两药物对其促凋亡和分化的影响,为两药联合治疗 AML 提供更多

的实验依据。

材料与方法

1. 仪器和试剂:地西他滨(5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷粉剂)购自 Sigma,丙戊酸钠粉剂(德巴金针)购自赛诺菲-安万特,Annexin V/PI 凋亡试剂盒、CD14-FITC、CD117-PE 均购自美国 BD 公司,流式细胞仪为美国 BD FACSCalibur 带分选模块。

2. 病例简介:患者,女性,2010 年 5 月初发 AML-M_{2a},47 岁,经阿糖胞苷联合柔红霉素联合化疗后获得初步缓解,10 个月后复发。复发时仍为 M_{2a},外周血 WBC 1.7 $\times 10^9$ /L,RBC 2.74 $\times 10^9$ /L,Hb 101g/L,PLT 123 $\times 10^9$ /L。原始细胞群主要流式髓系免疫表型:CD117:76.33%,CD14:11.13%,CD11b:18.12%,CD13:37.32%,CD33:3.62%。

3. 流式分选:使用患者复发时的骨髓 2ml,溶血后以 CD45-SSC 设门(图 1),选取中等 CD45 表达和低 SSC 的原始细胞群(图 1),分选至 50ml 分选管,分选多管(分选模式为得率优先),高速离心富集。

4. 细胞培养及药物处理:将富集后的细胞采用含 10% 小

基金项目:浙江省卫生厅医药科技计划项目(2011KYA169)

作者单位:316004 浙江省舟山医院

通讯作者:李翊卫,电子信箱:wangyekai@163.com

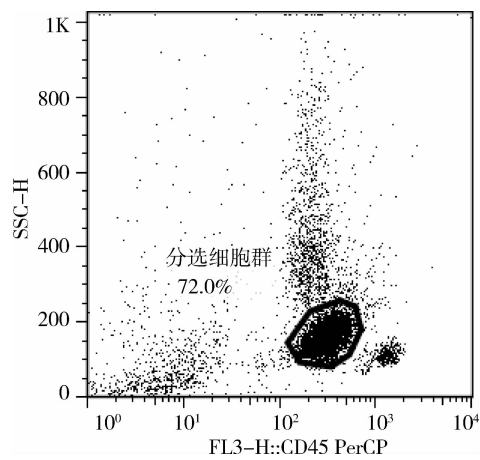


图1 AMI-M_{2a}原始细胞分选

牛血清的 RPMI 1640 培养液在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,同时加入药物(药物设立分组见表1),配制浓度为 1 × 10⁵ 个/毫升的细胞悬液接种于6孔培养板,2毫升/孔,置37℃、

表1 药物浓度组设立(其中药物浓度均为终浓度)

组别	DCA (μmol/L)	VPA (mmol/L)
空白对照组	0	0
DCA 单药 A 组	1.0	0
DCA 单药 B 组	4.0	0
VPA 单药组	0	2.0
联合用药 A 组	1.0	2.0
联合用药 B 组	4.0	2.0

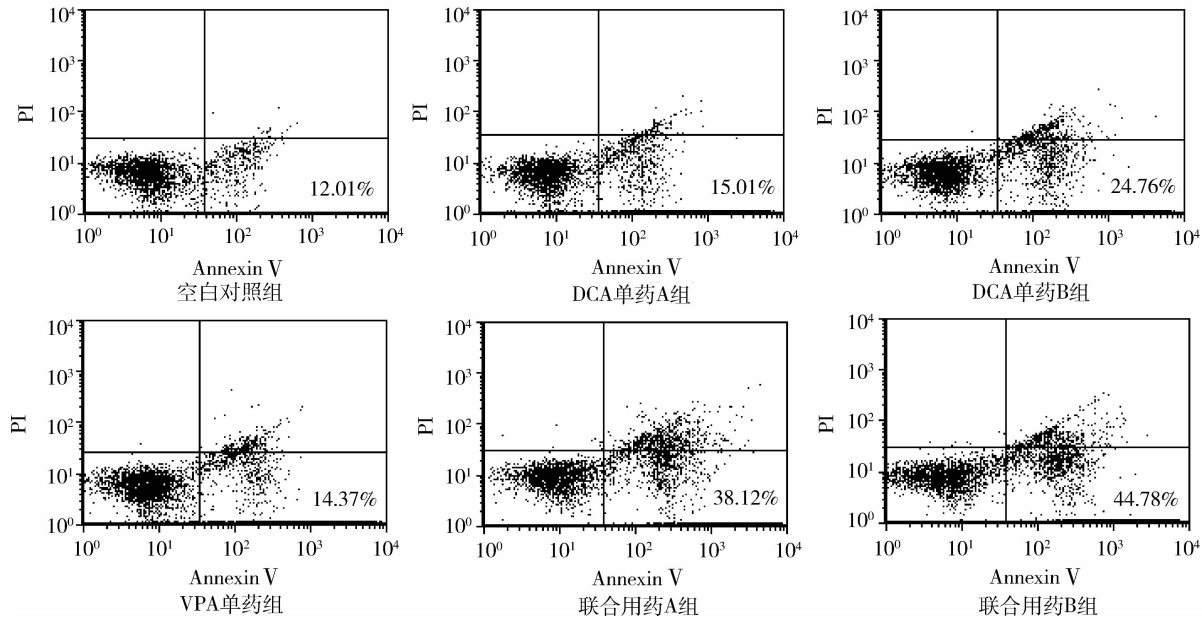


图2 各药物浓度组早期凋亡率(Annexin V⁺/PI⁻)

2. CD117、CD14 分化抗原检测:见图3、图4,空白对照组、DCA 单药 A 组、DCA 单药 B 组、VPA 单药

5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,,作用 48h 后各孔吸出培养液,分为 3 份进行以下各步实验,每份设置 6 个药物浓度组,每组设 3 复孔。

5. Annexin V/PI 标记法观察凋亡:取“细胞培养及药物处理”步骤中第 1 份细胞,用预冷 PBS 洗涤弃上清,残渣细胞收集至流式管。每管加 10μl Annexin V 和 5μl PI,避光静置 15min,加 200μl 预冷的 PBS,振荡混匀,上机检测其早期凋亡率。

6. CD117、CD14 检测:细胞培养及药物处理步骤第 2、3 份细胞用预冷 PBS 洗涤弃上清,残渣细胞收集至流式管。第 2 份加 CD117 10μl,第 3 份加 CD14 各 10μl,避光静置 15min 上机,计算 CD117 和 CD14 表达率。

7. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件,对各组中早期凋亡率、CD117 和 CD14 表达率做单因素方差分析和 LSD 两两检验,以 P < 0.05 为具有显著统计学意义。

结 果

1. Annexin V/PI 标记法检测凋亡:见图 2,空白对照组、DCA 单药 A 组、DCA 单药 B 组、VPA 单药组、联合用药 A 组、联合用药 B 组的早期凋亡率分别为 12.12% ± 0.84%、15.32% ± 0.75%、24.11% ± 2.10%、14.11% ± 2.13%、38.14% ± 2.10%、44.11% ± 2.12%,联合用药 A 组高于 DCA 单药 A 组和 VPA 单药组,差异具有显著统计学意义(P < 0.01),联合用药 B 组高于 DCA 单药 B 组和 VPA 单药组,差异具有显著统计学意义(P < 0.01)。

组、联合用药 A 组、联合用药 B 组的 CD117 表达率分别为 70.22% ± 1.92%、66.90% ± 1.23%、60.32% ±

2.10%、65.17% ± 1.09%、51.19% ± 1.46%、40.30% ± 2.18%，联合用药 A 组低于 DCA 单药 A 组和 VPA 单药组，差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)，联合用药 B 组低于 DCA 单药 B 组和 VPA 单药组，差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。DCA 单药 A 组、DCA 单药 B 组、VPA 单药组、联合用药 A 组、联合用药 B 组的 CD14 表达率分别为 7.32% ±

0.32%、9.11% ± 0.47%、13.45% ± 1.02%、12.22% ± 0.91%、17.13% ± 1.45%、19.11% ± 1.69%，联合用药 A 组高于 DCA 单药 A 组和 VPA 单药组，差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)，联合用药 B 组高于 DCA 单药 B 组和 VPA 单药组，差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

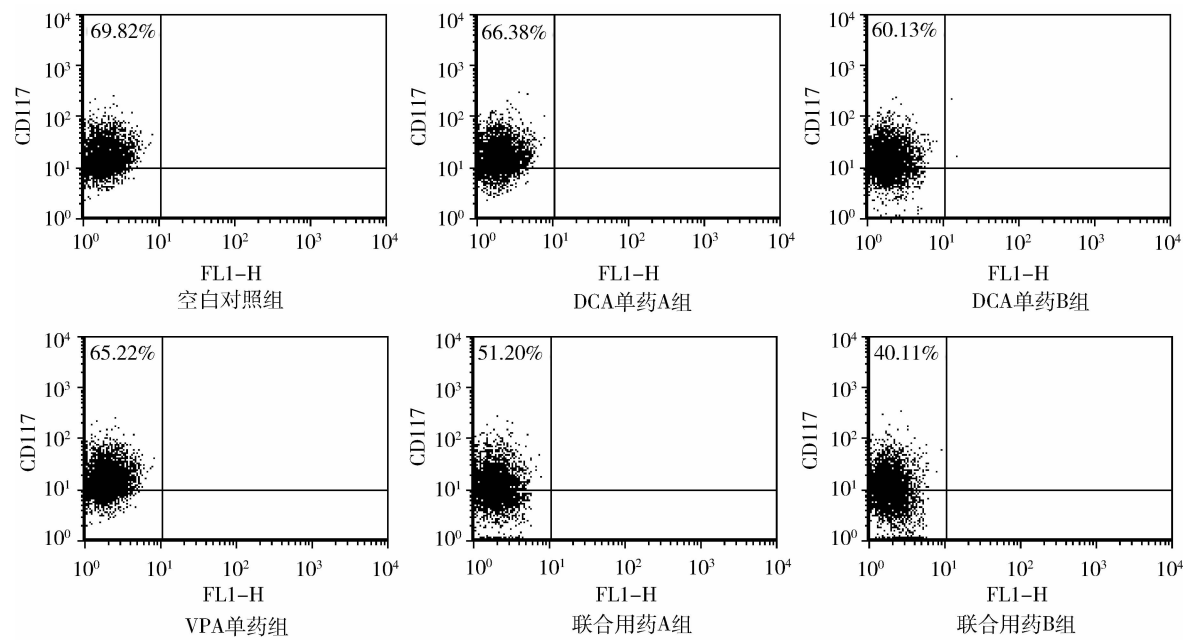


图 3 各药物浓度组 CD117 表达率

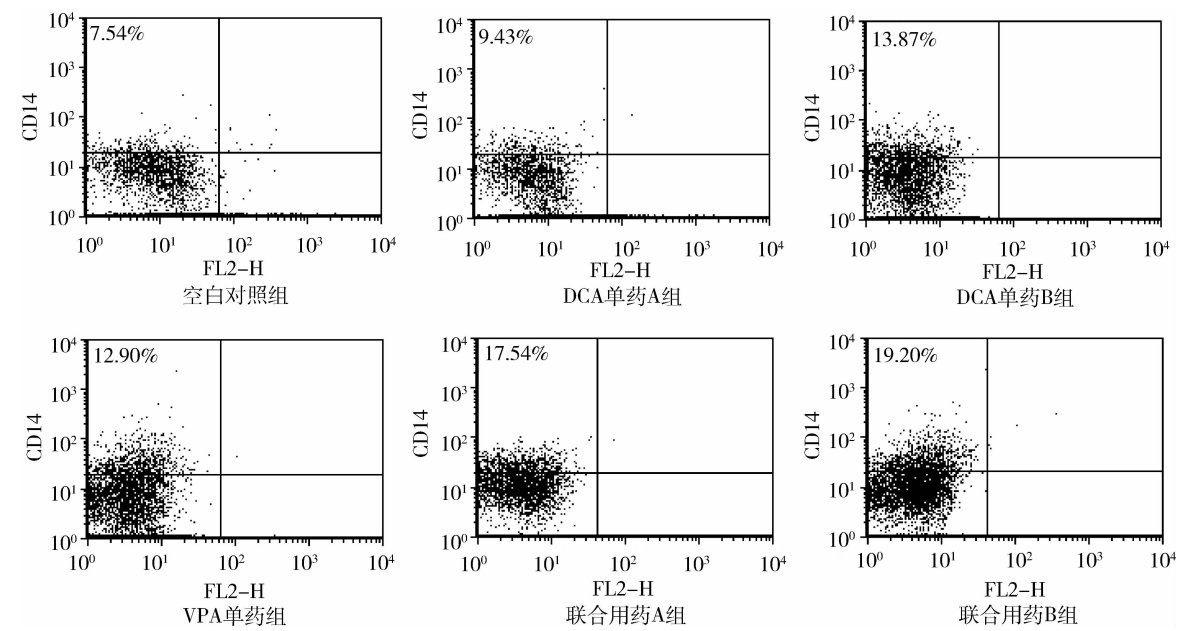


图 4 各药物浓度组 CD14 表达率

讨 论

DCA 作为一种甲基转移酶抑制剂,主要通过抑制 DNA 甲基转移酶,逆转 DNA 的甲基化过程,激活多种抑癌基因表达,诱导肿瘤细胞凋亡或向正常细胞分化^[3]。DCA 单用治疗骨髓异常增生综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)效果已超越传统治疗手段^[4-6]。MDS 一般在数月至数年内转化为 AML,且部分类别的核型异常的 MDS 进展为 AML 的可能性更大,DCA 在 MDS 治疗中的积极成果给治疗 AML 的探索奠定了基础^[7]。DCA 对于部分不能接受标准化疗方案(Ara - C + DNR)的老年 AML 患者、部分 MDS 转化而来的 AML 以及部分难治/复发 AML 患者效果较好,充分显示了其治疗 AML 的巨大潜力^[8,9]。但从目前国外总体的临床情况来看,DCA 对于 AML 治疗效果不如 MDS 稳定,存在较大的个体差异。国外研究表明 DCA 和 VPA 联用在体外多种肿瘤细胞中均体现出较佳的抗肿瘤活性和恢复抑癌基因表达的效果,如卢等^[10]联用 DCA 和 VPA 对 U266 细胞恢复抑癌基因 RASSF1A 基因的表达,Luszczek 等^[11]联用 DCA 和 VPA 作用于小细胞肺癌引起其 DNA 损伤。这都说明表观遗传学调控中,组蛋白去乙酰化和 DNA 甲基化两种机制可以相互协调,共同调控细胞活性。由于目前国内 DCA 尚未正式获批用于 AML 患者的治疗,因此我们通过流式分选出 AML 患者的骨髓原始细胞体外与药物作用观察其对白血病细胞的促凋亡分化作用。本研究显示 DCA 和 VPA 体外显示出协同促原始细胞凋亡的能力,其中空白对照组的早期凋亡率达到了 10% 左右,可能和细胞经流式电极分选后的表面轻度损伤有关。

在临床治疗 MDS 的应用中,DCA 主要的不良反应为骨髓抑制导致血三系降低,而引起感染风险的增加,一般需要口服抗生素加以预防。有报道显示,DCA 能促进 MDS - RAEB 细胞株 SKM - 1 向成熟髓系细胞分化,增强 CD14 和 CD11b 成熟髓系抗原的表达,CD14 为脂多糖(LPS)受体,存在于单核细胞、巨噬细胞等细胞表面的白细胞分化抗原,识别、结合 LPS,介导 LPS 性细胞反应,在 LPS 性炎症反应、内毒素休克等病理反应中起重要作用^[12,13]。本研究显示 DCA 和 VPA 体外联用能促进 CD14 的表达,提示其增强了体外抗革兰阴性菌能力。CD117 作为 c - kit 受体膜外区分子表面抗原标志,表达于造血祖细胞、不成熟粒细胞和肥大细胞,多数 AML 的原始细胞中均有 CD117 的表达,并且 CD117 的高表达和细胞的恶性程

度相关,往往预示着预后不良。本研究还显示 VPA 协同 DCA 降低 CD117 的表达,从分化抗原角度说明它们能共同作用于降低肿瘤细胞的恶性程度。但是体内两药联用是否也存在类似的效应,尚需进一步研究。

参考文献

- 1 王晔恺,周吉航,周世权,等. 急性髓系白血病患者 hPer3 基因启动子甲基化状态及其去甲基化对白血病细胞增殖的影响[J]. 中华血液学杂志,2011,32(5):317-321
- 2 Blum W, Klisovic RB, Hackanson B, et al. Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(25):3884-3891
- 3 Bryan J, Kantarjian H, Garcia - Manero G, et al. Pharmacokinetic evaluation of decitabine for the treatment of leukemia[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2011, 7(5):661-672
- 4 Lubbert M, Suciu S, Baila L, et al. Low - dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate - or high - risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(15):1987-1996
- 5 Santos FP, Kantarjian H, Garcia - Manero G, et al. Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2010, 10(1):9-22
- 6 Steensma DP. Decitabine treatment of patients with higher - risk myelodysplastic syndromes [J]. Leuk Res, 2009, 33 Suppl 2:S12-17
- 7 Cui W, Sun J, Cotta CV, et al. Myelodysplastic syndrome with inv (3)(q21;q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2) has a high risk for progression to acute myeloid leukemia [J]. Am J Clin Pathol, 2011, 136(2):282-288
- 8 Cashen AF, Schiller GJ, O'Donnell MR, et al. Multicenter, phase II study of decitabine for the first - line treatment of older patients with acute myeloid leukemia [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(4):556-561
- 9 Lubbert M, Minden M. Decitabine in acute myeloid leukemia [J]. Semin Hematol, 2005, 42(3 Suppl 2):S38-42
- 10 卢菲, 刘传方, 马道斯, 等. 丙戊酸钠协同 5 - 杂氮 - 2' - 脱氧胞苷对 U266 细胞 RASSF1A 基因表达调控的影响 [J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(4):223-227
- 11 Luszczek W, Cheriath V, Mekhail TM, et al. Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN - stimulated gene expression [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(8):2309-2321
- 12 杨力, 徐瑞容, 黄红铭, 等. 地西他滨对 MDS 细胞株 SKM - 1 的作用研究 [J]. 交通医学, 2007, 21(1):34-35
- 13 Dessing MC, Knapp S, Florquin S, et al. CD14 facilitates invasive respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(6):604-611

(收稿:2011-09-15)

(修回:2011-10-08)