

# The Effects of Nilotinib and Arsenic Trioxide on the Proliferation and Apoptosis of K562 Cells

Xiaohan Gao, Jie Li, Jie Yang, Jun Yuan, Ruicang Wang, Yan Li, Suyun Wang, Hongling Hao\*

Department of Hematology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang Hebei

Email: [h0707@163.com](mailto:h0707@163.com)

Received: Nov. 16<sup>th</sup>, 2017; accepted: Nov. 30<sup>th</sup>, 2017; published: Dec. 8<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

**Objective:** To explore whether Nilotinib (AMN107) and arsenic trioxide (ATO) had synergistic effect, to provide theoretical basis for the new treatment of chronic myelocytic leukemia. **Methods:** K562 cells were cultivated *in vitro*, treated with AMN107, ATO or both; Cell proliferation of K562 cells were evaluated by using a MTT assay. Cell apoptosis of K562 cells were examined by using Flow cytometry. Cell cycle of K562 cells were analysed by using Flow cytometry. The expression levels of BCR-ABL fusion genes of K562 cells were analyzed by using RT-PCR. **Results:** MTT shows that both of the AMN107 and ATO can inhibit the growth of the cells of K562, the combination of the two drugs was better than single one. Flow cytometry detected the cell apoptosis (%), AMN107 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) was  $74.86 \pm 1.86$ , ATO (5  $\mu\text{mol/L}$ ) was  $24.12 \pm 2.03$ , the combination were  $84.60 \pm 1.80$ . RT-PCR shows that the combination group treated with the K562 cells after 24 h, 48 h, 72 h, the RQ of BCR/ABL were:  $0.51 \pm 0.00$ ,  $0.46 \pm 0.00$ ,  $0.37 \pm 0.02$ . The results were better than single one ( $P < 0.05$ ).

## Keywords

Nilotinib, Arsenic Trioxide, K562, Apoptosis

# 尼洛替尼联合三氧化二砷对K562细胞增殖及凋亡的影响

高晓晗, 李杰, 杨洁, 袁军, 王瑞仓, 李燕, 王素云, 郝洪岭\*

河北省人民医院血液科, 河北 石家庄

Email: [h0707@163.com](mailto:h0707@163.com)

\*通讯作者。

**文章引用:** 高晓晗, 李杰, 杨洁, 袁军, 王瑞仓, 李燕, 王素云, 郝洪岭. 尼洛替尼联合三氧化二砷对 K562 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 世界肿瘤研究, 2018, 8(1): 1-5. DOI: [10.12677/wjcr.2018.81001](https://doi.org/10.12677/wjcr.2018.81001)

收稿日期：2017年11月16日；录用日期：2017年11月30日；发布日期：2017年12月8日

## 摘要

**目的：**探讨尼洛替尼(AMN107)与三氧化二砷(ATO)是否具有协同作用，为寻找慢性髓细胞白血病治疗新方法提供理论基础。**方法：**体外培养K562细胞，分别加入AMN107、ATO及两者联合干预细胞生长；MTT法检测药物对K562细胞增殖的影响；流式细胞仪检测药物对K562细胞凋亡的影响；流式细胞仪检测药物对K562细胞的细胞周期的影响；RT-PCR检测各组K562细胞BCR-ABL融合基因表达水平的变化。**结果：**MTT结果示AMN107、ATO均能够抑制K562细胞的生长，但两者联合较单药效果更佳，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。流式细胞仪检测细胞凋亡率(%), AMN107 (10  $\mu\text{mol/L}$ )凋亡率为 $74.86 \pm 1.86$ , ATO (5  $\mu\text{mol/L}$ )凋亡率为 $24.12 \pm 2.03$ , 两者联合可达到 $84.60 \pm 1.80$ 。RT-PCR检测显示ATO联合AMN107作用于K562细胞24 h、48 h、72 h后BCR/ABL融合基因的RQ比值分别为： $0.51 \pm 0.00$ 、 $0.46 \pm 0.00$ 、 $0.37 \pm 0.02$ 。比两者单用BCR/ABL的比值更低。差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 关键词

尼洛替尼, 三氧化二砷, K562细胞, 凋亡

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

慢性髓细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)是一种发生在多能造血干细胞上的恶性骨髓增殖性肿瘤，其特异性表达 BCR/ABL 融合基因，编码 P210 蛋白，具有酪氨酸激酶活性，从而导致 CML 的发生。分子靶向药物——酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)的问世，为 CML 的治疗带来了革命性的进展。然而 TKIs 治疗过程中出现的耐药或不耐受的情况使得疾病治疗中断，甚至部分 CML 患者出现疾病复发等问题迫使人们进一步探索新的治疗策略。本研究通过体外培养慢性髓细胞白血病细胞株 K562 细胞，经尼洛替尼(AMN107)、三氧化二砷(ATO)或两者联合干预，观察 K562 细胞的增殖及凋亡的情况，比较药物干预前后 BCR-ABL 基因表达水平的变化，探讨两药是否具有协同作用，现报道如下。

## 2. 材料与方法

1) 主要材料：K562 细胞由河北医科大学第二医院赠送；ATO 购自美国 sigma 公司；AMN107 为诺华公司赠送。

2) 细胞培养：体外培养 K562 细胞。分为空白对照组与实验组。空白对照组只加培养基和细胞；实验组分为 AMN107 组、ATO 组和 AMN107 + ATO 组，共 3 组，培养 3 天。

3) MTT 法检测细胞增殖：取各组 K562 细胞，调节细胞浓度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ，接种于 96 孔板中，每组设 6 个平行孔，培养终止前 4 h 每孔加入 MTT (5 mg/ml) 20  $\mu\text{l}$ ，继续培养 4 h，每孔加入三联液 100  $\mu\text{l}$ ，震荡 30 min，放入培养箱中过夜。置酶标仪读取吸光度 A 值。根据如下公式计算细胞生长抑制率：细胞生长抑制率 = [对照组 A 值 - 实验组 A 值]/对照组 A 值  $\times 100\%$ 。

4) 流式细胞仪检测细胞周期: 收集各组 K562 细胞, PBS 洗 2 次, 70% 乙醇固定。固定好的细胞 1500 r/min, 5 min, 离心去上清, 用 1 ml PBS 重悬, 400 目筛网过滤 1 次。取 200  $\mu$ l 细胞悬液加 800  $\mu$ l 碘化丙啶(PI)染液, 混匀, 避光染色 30 min。用流式细胞仪检测, ModFit LT 软件进行细胞周期分析。

5) Annexin V-FITC/PI 染色法流式细胞仪检测细胞凋亡: 取各组 K562 细胞, 接种于 12 孔板中, 培养 48 h, 将培养板中的细胞转移到流式管中, 1200 rpm, 10 min, 弃上清, 调节细胞数为  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个, 将细胞重悬于 200  $\mu$ l Buffer 中, 加入 10  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l PI, 震荡 1 min, 加入 10  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l PI, 震荡 1 min, 上流式细胞仪检测。

6) RT-PCR 检测 BCR/ABL 融合基因的表达: 取各组 K562 细胞, 提取总 RNA, 逆转录为 cDNA 后进行基因扩增。BCR 引物序列: 上游: 5'-GAGAGAAGAGGGCGAACA-3', 下游: 5'-GACATAAGCAGCAG CAGTGAC-3'。ABL 引物序列: 上游: 5'-ACATCACGCCAGTCAACAG-3', 下游: 5'-GCAGATACTCAGCGG CATT-3'。反应体系 20  $\mu$ l: 样品 8  $\mu$ l, Mix 酶 10  $\mu$ l, Primer 1  $\mu$ l + 1  $\mu$ l。反应条件: 96 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次。结果检测: 扩增完毕后, 进入结果分析界面, 以 GAPDH 为内参参照基因, 与对照组相比(对照组 RQ 值为 1.0), 得到目的基因表达的相对定量值(RQ 值), 将 RQ 值用于统计分析。

7) 应用 spss13.0 进行统计学分析。

### 3. 结果

1) AMN107 与 ATO 对 K562 细胞增殖的影响: MTT 结果示: AMN107 或 ATO 对 K562 细胞增殖均有抑制作用且呈剂量和时间依赖性。AMN107 联合 ATO 组较两药单独应用细胞生长抑制率更高, 见表 1。

2) AMN107 与 ATO 对 K562 细胞增殖的影响: AMN107 或 ATO 均可引起 K562 细胞的凋亡, 且两者联合较单药对引起 K562 细胞的凋亡率更高, 见表 2。

3) ATO 对 K562 细胞周期分布的影响: 5  $\mu$ mol/L ATO 处理 K562 细胞后, G0/G1 期细胞的比例(%) 较对照组明显增加( $38.57 \pm 0.39$  vs  $18.65 \pm 0.33$ ,  $P < 0.05$ )。

4) AMN107 联合 ATO 较 AMN107 或 ATO 单药作用使得 K562 细胞表达 BCR-ABL 基因表达水平更低, 详细结果见表 3。

**Table 1.** Growth inhibitory rate treated with different drugs (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

**表 1.** 不同药物对生长抑制率的影响

	Concentration ( $\mu$ M)	Time (24 h)	Time (48 h)	Time (72 h)
ATO	1	$10.25 \pm 1.38$	$15.88 \pm 1.11$	$20.07 \pm 1.46$
	2.5	$20.38 \pm 1.27$	$24.75 \pm 1.45$	$30.59 \pm 1.72$
	5	$25.58 \pm 1.69$	$34.06 \pm 1.20$	$48.30 \pm 2.26$
AMN107	2.5	$30.27 \pm 1.58$	$35.34 \pm 1.00$	$45.65 \pm 1.84$
	5	$51.55 \pm 2.72$	$58.64 \pm 1.45$	$63.44 \pm 1.70$
	10	$62.74 \pm 1.77$	$67.05 \pm 1.63$	$72.07 \pm 1.74$
AMN107 (10) + ATO (5)		$72.06 \pm 2.19$	$81.36 \pm 1.24$	$85.24 \pm 1.36$

**Table 2.** Apoptosis rate treated with ATO, AMN107, ATO + AMN107 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

**表 2.** 三氧化二砷、尼洛替尼以及两者联合对细胞凋亡的影响

Concentration	Control group		ATO		AMN107		Combined group	
	0	1	2.5	5	2.5	5	10	10 + 5
Rate	$2.26 \pm 0.63$	$4.21 \pm 0.62$	$4.21 \pm 0.62$	$24.12 \pm 2.03$	$30.00 \pm 1.48$	$63.78 \pm 1.91$	$74.86 \pm 1.86$	$84.60 \pm 1.80$

**Table 3.** Expression levels of BCR-ABL after treatment of AMN107, ATO, ATO + AMN107 ( $\bar{x} \pm s$ )**表 3.** 不同药物对 BCR-ABL 基因表达水平的影响

Concentration (uM)		Time (24 h)	Time (48 h)	Time (72 h)
Control group	0	1.39 ± 0.07	1.22 ± 0.03	1.18 ± 0.02
ATO	1	1.12 ± 0.02	1.06 ± 0.01	1.02 ± 0.01
	2.5	1.01 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.91 ± 0.01
	5	0.89 ± 0.00	0.85 ± 0.01	0.79 ± 0.00
	2.5	0.84 ± 0.02	0.79 ± 0.02	0.71 ± 0.02
AMN107	5	0.78 ± 0.02	0.72 ± 0.02	0.63 ± 0.01
	10	0.66 ± 0.03	0.59 ± 0.01	0.51 ± 0.01
	AMN107 (10) + ATO (5)	0.51 ± 0.00	0.46 ± 0.00	0.37 ± 0.02

#### 4. 讨论

在 CML 中, BCR-ABL 融合基因转录为 8.5 kb 的 mRNA, 并翻译产生分子量为 210 KD 的 BCR-ABL 融合蛋白 P210BCR-ABL, 该蛋白编码的产物具有酪氨酸激酶活性[1], 能磷酸化多种蛋白质底物上的酪氨酸残基, 作用于 BCR-ABL 下游的一系列信号转导通路, 导致 CML 的发生。TKIs 的问世为 CML 的治疗带来了革命性的进展, 它能特异性阻断 ATP 在 *abl* 激酶上的结合位置, 使酪氨酸残基不能磷酸化, 从而抑制 BCR-ABL 阳性细胞增殖。本研究以不同浓度 AMN107 作用于 K562 细胞 3 天后发现 BCR-ABL 融合基因的表达水平明显下降, 细胞生长抑制率及细胞凋亡率明显增加。KJ、Landry [2] [3]等的研究也证实了这一结论。

然而 TKIs 对 CML 的起始干细胞(Lekumia intial cells, LICs)无作用, 导致部分患者出现耐药或停药后复发, 或由于点突变、基因扩增等产生 TKIs 耐药或不耐受等问题, 因此寻找新的治疗靶点是我们目前迫切需要的[4]。目前研究热点为利用不同化疗药物的作用靶点及机制的不同增加各个化疗药物对肿瘤细胞的杀伤力, 或联合用药以减少单药高剂量带来的毒副作用及耐药。

我国学者自 19 世纪 70 年代开始应用砷制剂治疗白血病, 目前 ATO 在治疗急性早幼粒细胞白血病 (APL)方面已取得巨大进展, 最近发现 ATO 在 CML 治疗中也有一定的价值, Dennis J 及 Luo 报道 ATO 作用于 K562 细胞能通过诱导细胞自噬等途径下调 BCR-ABL 基因的表达[5] [6]。Dennis 同时报道 ATO 可以通过自噬性溶酶体和蛋白酶介导的降解组织蛋白酶 B 上的 P62/SQSTM1 而靶向作用于 BCR-ABL 融合基因, 使其表达水平下调。Luo 等发现 ATO 能够通过抑制 VEGF 的表达, 继而阻断其下游一系列信号途径包括 PI3K/PIP3/Akt/PKB、MAPKAPK2/HSP27 和 Ras/MEK/ERK, 下调 BCR-ABL 融合基因水平, 阻断 CML 的发生。ATO 还能阻断细胞周期进程, 使之不能进入 S 期完成有丝分裂, 从而抑制细胞增殖[7]。本研究应用流式细胞仪检测经 ATO 干预后的 K562 细胞的细胞周期的变化, 结果显示, ATO 作用于 K562 细胞后使停滞在 G0/G1 期的 K562 细胞比例增加, S 期、G2M 期细胞比例减少。应用 RT-PCR 比较 ATO 干预 K562 细胞前后 BCR-ABL 基因表达的变化发现 ATO 能降低 BCR-ABL 基因的表达水平。

本研究结果显示 AMN107 与 ATO 均能够诱导细胞凋亡, AMN107 诱导 K562 细胞凋亡的能力是 ATO 的 2~3 倍, 然而黄先豹报道 AMN107 (5 umol/L)与 ATO (5 umol/L)干预 K562 细胞后细胞凋亡率分别为  $60.98 \pm 2.46$  vs  $60.98 \pm 2.28$ , 两者效果相等, 与本研究结果存在一定的差异, 考虑可能与细胞株来源不同、作用时间不同等有关。Xia Y [8]等研报道 AMN107 与 ATO 在诱导 K562 细胞凋亡方面存在协同作用。本研究也证实 AMN107 与 ATO 两者联合作用于 K562 细胞, 细胞生长抑制率和凋亡率均较两者应用效果更佳, BCR-ABL 基因表达水平较两者单独作用表达更低, 因此推测 ATO 与 AMN107 能够通过不同的作用途径协同抑制 BCR-ABL 基因的表达。然而两者具体是作用于哪些信号分子而协同发挥效应的, 是我们今后进一步研究的方向。

## 参考文献 (References)

- [1] Simonsson, B., Hjorth-Hansen, H., Bjerrum, O.W., *et al.* (2011) Imatinib for Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Current Drug Targets*, **12**, 420-428.
- [2] Aichberger, K.J., Mayerhofer, M., Krauth, M.T., *et al.* (2005) Low-Level Expression of Proapoptotic Bcl-2-Interacting Mediator in Leukemic Cells in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Role of BCR/ABL, Characterization of Underlying Signaling Pathways, and Reexpression by Novel Pharmacologic Compounds. *Cancer Research*, **65**, 9436-9444. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0972>
- [3] Landry, W.D., Woolley, J.F., Cotter, T.G., *et al.* (2013) Imatinib and Nilotinib Inhibit BCR-ABL-Induced ROS through Targeted Degradation of the NADPH Oxidase Subunit p22phox. *Leukemia Research*, **37**, 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.11.003>
- [4] Wang, W., Lv, F.F., Du, Y., Chen, L., *et al.* (2015) The Effect of Nilotinib Plus Arsenic Trioxide on The proliferation and Differentiation of Primary Leukemic Cells from Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Blast Crisis. *Cancer Cell International*, **15**, 10.
- [5] Luo, X.C., Feng, M.X., Zhu, X.J., *et al.* (2013) VEGF Depletion Enhances BCR-ABL-Specific Sensitivity of Arsenic Trioxide in Chronic Myelogenous Leukemia. *Hematology*, **18**, 334-340. <https://doi.org/10.1179/1607845413Y.0000000083>
- [6] Dennis, J.G., Elias, G., Edward, J., *et al.* (2012) Autophagic Degradation of the BCR-ABL Oncoprotein and Generation of Antileukemic Responses by Arsenic Trioxide. *Blood*, **120**, 3555-3562. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-402578>
- [7] Jing, Y., Wang, L., Xia, L., *et al.* (2001) Combined Effect of All-Trans Retinoic Acid and Arsenic Trioxide in Acute Promyelocytic Leukemia Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Blood*, **97**, 264-269. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.1.264>
- [8] Xia, Y., Fang, H., Zhang, J., *et al.* (2013) Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in Imatinib-Resistant Leukemic K562-r Cells Triggered by AMN107 Combined with Arsenic Trioxide. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, **238**, 932-942. <https://doi.org/10.1177/1535370213492689>

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-9049, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [wjcr@hanspub.org](mailto:wjcr@hanspub.org)